Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut
der Universität Göttingen

Die funktionelle Regulation der Chloroplastenstruktur von CHLAMYDOBOTRYS STELLATA

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Bettina Thiede
aus Petershagen (Lahde)

Göttingen 1974

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut
der Universität Göttingen

Die funktionelle Regulation der Chloroplastenstruktur von CHLAMYDOBOTRYS STELLATA

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Bettina Thiede
aus Petershagen (Lahde)

Göttingen 1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Professor Dr. W. Wießner

Korreferent: Professor Dr. A. Pirson

Tag der mündlichen Prüfung: 1.11.1974

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

2. Material und Methoden 6

2.1. Versuchsobjekt und Kulturmethoden 6

2.2. Die Isolierung von Chloroplasten 7

2.3. Elektronenmikroskopische Methoden 7

2.4. Analytische Untersuchungsmethoden 9

3. Ergebnisse

3.1. Die Chloroplastenstruktur von Chlamydobotrys stellata und ihre Regulation 10

3.1.1. Die Chloroplastenstruktur in Abhängigkeit von der Ernährungsweise 10

3.1.2. Die Wirkung von Magnesiumionen auf die thylakoidale Struktur isolierter Chloroplasten 19

3.1.3. Die nach Gefrierätzung isolierter Chloroplasten sichtbare Membranstruktur 25

3.1.4. Die im Negativkontrastverfahren erkennbare Struktur der Thylakoidoberflächen 37

3.1.5. Die nach Tiefenätzung sichtbare Struktur der Thylakoidoberflächen 42

3.1.6. Die Chloroplastenstruktur nach einem Wechsel der Ernährungsbedingungen in Gegenwart von Hemmstoffen der Proteinsynthese 46

3.1.7. Die Chloroplastenstruktur bei gestörter Photosynthese 53

3.2. Diskussion 63

3.3. Die Regulation der physiologischen Leistung in Abhängigkeit von der Kohlenstoffversorgung 72

3.3.1. Die physiologische Adaptation bei einem Wechsel in der Ernährungsweise 74

3.3.2. Der Einfluß des Photosynthesegiftes 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU) auf die stoffwechselphysiologische Adaptation von Chlamydobotrys stellata 86

3.3.3. Die Wirkungen von Chloramphenicol und Cycloheximid auf die stoffwechselphysiologische Leistung von Chlamydobotrys stellata 92

3.3.3.1. Die Beeinflussung autotropher Kulturen von Chlamydobotrys stellata durch Chloramphenicol und Cycloheximid 93

3.3.3.2. Die Wirkungen von Chloramphenicol und Cycloheximid auf den Adaptationsvorgang von der Autotrophie an die Photoheterotrophie und vice versa 107

3.4. Diskussion 116

4. Literaturverzeichnis 121

1. Einleitung

Die elektronenmikroskopisch sichtbare Organisation des Chloroplasten der einzelligen, obligat phototrophen volvocalen Grünalge Chlamydobotrys stellata entspricht bei autotropher Anzucht des Organismus generell der auch von anderen grünen Algen und von höheren Pflanzen bekannten Struktur, d. h. es sind deutlich ausgeprägte Grana vorhanden : Die Membranen benachbarter Thylakoide berühren einander streckenweise. Andere Membranbezirke sind durch Invagination zu Pseudograna aufgefaltet. Ferner können einzelne Thylakoide über längere Strecken miteinander "fusionieren", ohne daß dabei eine typische Granastruktur entsteht. Wenn diese Alge jedoch photoheterotroph (Licht und Acetat) kultiviert wird, ändert sich die Struktur des Chloroplasten in auffälliger Weise :Seine Thylakoide sind langgestreckt und überwiegend deutlich voneinander getrennt (Merrett 1969, Wießner und Amelunxen 1969 a). Eine Granakonfiguration tritt nur noch vereinzelt auf.

Diese Strukturunterschiede sind mit charakteristischen Unterschieden im physiologischen Verhalten von Chl. stellata verbunden. Bei photoheterotropher Kultur a) deckt diese Alge ihren zur Photoassimilation von Acetat notwendigen Bedarf an Adenosintriphosphat allein durch cyclische Photophosphorylierung im sogenannten Photosystem I, und ist b) die Leistung des offenkettigen Elektronentransportes stark reduziert (Wießner und Gaffron 1964, Wießner 1965, Merrett 1969, Wießner und Fork 1970). Photoautotroph ernährter Chl. stellata hingegen besitzt

ein normales photosynthetisches Elektronentransportsystem (Photosystem II und I). In gleicher Weise hängen auch die Aktivitäten der bei der Kohlendioxid- bzw. Acetatassimilation beteiligten biochemischen Reaktionen der Kohlenstoffassimilation von der Ernährungsweise der Alge ab (Wießner und Kuhl 1962, Wießner 1963, Wießner 1968). Ferner treten Unterschiede im Absorptionsverhalten der autotroph und der photoheterotroph kultivierten Alge auf, die auf quantitative Unterschiede im Gehalt an Chlorophyll-a-Proteiden hindeuten (Wießner 1969, Wießner und French 1970).

Die Beziehung zwischen der Chloroplastenstruktur und der stoffwechselphysiologischen Leistung von Chl. stellata konnte bislang nicht geklärt werden. Insbesondere ist unbekannt, ob - und gegebenfalls welche - substrukturelle(n) Unterschiede der Thylakoidmembranen mit den Änderungenn im photosynthetischen, von den Ernährungsbedingungen verursachten Verhalten der Alge kausal verbunden sind und auf welche Weise Photosyntheseleistung und Chloroplastenstruktur in vivo reguliert werden.

Zur Klärung dieser Fragen habe ich daher die folgenden drei Aufgabenkomplexe bearbeitet :

1. Analyse der thylakoidalen Substruktur von Algen mit unterschiedlicher Photosyntheseaktivität unter Einsatz der elektronenmikroskopischen Verfahren der Gefrierätzung, der Tiefenätzung und der Negativkontrastierung und der Vergleich meiner Ergebnisse mit den bereits von anderer Seite für andere Algen

und höhere Pflanzen vorgelegten Befunden. Methodisch aussichtsreich erschien mir insbesondere die Gefrierätztechnik, da mit ihrer Hilfe dem Photosystem II zugeschriebene Struktureinheiten (Arntzen et al. 1969) bereits nachgewiesen und außerdem sowohl bei höheren Pflanzen (Remy 1969, Phung Nhu Hung et al. 1969, Sane et al. 1970) als auch bei Grünalgen (Goodenough und Staehelin 1971, Pendland und Aldrich 1973) spezifische, die angenommenen funktionellen Unterschiede im Grana- und Intergranabereich begleitende strukturelle Abweichungen sichtbar gemacht werden konnten.

2. Überprüfung der Frage, ob die im Ultradünnschnitt sichtbare Struktur kurzfristig durch Veränderung des Leistungsanspruches an den Chloroplasten (cyclischer oder nicht-cyclischer Elektronentransport) beeinflußt werden kann und ob eine gegebene strukturelle Organisation (Partitionkonfiguration) tatsächlich die Voraussetzung für ein funktionsfähiges Photosystem II (Homann und Schmid 1967, Wießner und Amelunxen 1969 a) oder erst eine sekundär auftretende Folgeerscheinung ist. Diese Fragen wurden bisher nur an Mutanten (Homann und Schmid 1967, Goodenough und Mitarbeiter 1969) und C_4-Pflanzen (Bishop 1971) bearbeitet, denen parallel zu einer verringerten oder fehlenden Photosystem -II- Aktivität auch die Granakonfiguration fehlt. Bei Mutanten ist aber ohne genaue Kenntnis vom Ansatzpunkt der Mutation nicht zu entscheiden, ob a) ein mutiertes Photosystem II die Veränderungen in der Struktur hervorruft, oder ob b) als Folge der Mutation strukturelle Membranelemente fehlen oder dergestalt verändert sind, daß das System II - obwohl vor-

handen - nicht mehr funktionstüchtig ist. Mit Chlamydobotrys stellata, bei dem die Struktur des Chloroplasten nicht erst durch Mutation, sondern unmittelbar durch die Veränderung in der Ernährungsweise beeinflußt werden kann, stand für diese Untersuchungen ein gegenüber den Mutanten unvergleichbar günstigeres Objekt zur Verfügung.

3. Ein weiterer Schwerpunkt meiner Arbeit waren die folgenden Fragen :

a) Welche der beiden Kohlenstoffquellen, das Acetat oder das CO_2, wirkt regulierend auf die Photosyntheseaktivität, den Gehalt an Chlorophyll-a-Proteiden, den Chlorophyll-b-Gehalt und die Struktur des Chloroplasten bei dem Übergang von der Photoheterotrophie zur Autotrophie bzw. vice versa; in anderen Worten : Induziert das CO_2 oder das Acetat die physiologische Zustandsänderung?

b) Verläuft die physiologische Regulation auf der Ebene der Translation oder erfolgt sie über durch Stoffwechselprodukte ausgelöste Aktivierungen bzw. Inaktivierungen von Enzymaktivitäten ?

Meine Arbeit gliedert sich daher in die folgenden beiden Abschnitte :

A. Die Struktur des Chloroplasten von Chlamydobotrys stellata und ihre Regulation. (In diesem Teil werden die Aufgabenstellungen 1. und 2. bearbeitet.)

und

B. Die Regulation der physiologischen Leistung von Chlamydobotrys stellata in Anhängigkeit von der Kohlenstoffversorgung.

(Hier werden die in der Aufgabenstellung 3. a und b aufgeworfenen Fragen behandelt.)

Den experimentellen Befunden jedes dieser Abschnitte ist die Diskussion der Ergebnisse aus Gründen der Übersichtlichkeit jeweils getrennt angefügt worden.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchsobjekt und Kulturmethoden

Als Versuchsobjekt diente Chlamydobotrys stellata (Stamm 10-1e der Sammlung von Algenkulturen des Pflanzenphysiologischen Institutes der Universität Göttingen).
Die Anzucht der Organismen erfolgte unter autotrophen (Licht und CO_2) oder photoheterotrophen (Licht und Acetat) Ernährungsbedingungen in der von Wießner (1968) beschriebenen Nährlösung. Die Lichtintensität betrug 9 000 lux, die Temperatur 30° C. Autotrophe Kulturen wurden mit einem Luft/CO_2 - Gemisch von 2 Vol. % CO_2 begast, photoheterotrophe Kulturen mit Luft, die durch Einleiten in gesättigte Natronlauge von ihrem ursprünglichen CO_2-Gehalt befreit worden waren. Durch automatische Rücktitration mit 30 %iger Essigsäure wurde die durch den Essigsäureverbrauch bei photoheterotrophen Kulturen bedingte pH-Änderung ausgeglichen und der pH-Wert auf pH 7,0 ± 0,2 konstant gehalten. Die in autotrophen Anzuchten eintretende Verschiebung in den sauren pH-Bereich wurde durch Zugabe von 1/10 n Natronlauge verhindert. Zur Umstellung des ursprünglich photoheterotroph ernährten Chl. stellata auf autotrophe Bedingungen wurden die Algen kurzfristig abzentrifugiert (200 × g, 1 min) und anschließend vor der autotrophen Weiterkultur einmal mit acetatfreier Nährlösung gewaschen. An veränderte Ernährungsbedingungen wurden die Algen in der Regel sechs Stunden lang adaptiert. Die Zugabe der Gifte DCMU [3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff], Chloramphenicol und Cycloheximid erfolgte jeweils eine halbe Stunde vor dem Wechsel der Kohlen-

stoffquelle.

2.2. Die Isolierung von Chloroplasten

Chloroplastenfragmente wurden im wesentlichen nach der von Goodenough und Staehelin (1971) angegebenen Methode bei 4^{o} C isoliert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Organismen in einen 50 mM Tris HCl-Puffer (pH 8,0) überführt, der 500 mM Saccharose, 20 mM $MgSO_4$ und 0,25 % Rinderserumalbumin enthielt und in einer Yeda-Presse (Research and Development Co. LTD. Rehovot, Israel) bei 60 Kp/cm^2 aufgebrochen. Anschließend wurden intakte Zellen und Zellwände von den Fragmenten durch Zentrifugation (500 x g, 5 min) zentrifugiert. Hierbei setzten sich die Chloroplastenfragmente als "pellet" ab, das erneut im Isolationsmedium aufgenommen und aufgeschwemmt wurde. Spinatchloroplasten wurden in Anlehnung an die bei Jacobi (1963) angegebene Methodik isoliert, in den obengenannten Puffer überführt und beim weiteren Isolierungsvorgang wie gewaschene Algenzellen behandelt. Bei Anwendung des Negativkontrastverfahrens wurden einige Chloroplastenproben innerhalb einer Stunde bei Raumtemperatur dreimal mit 1 mM EDTA (Äthylendiamintetraacetat) in 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) gewaschen und anschließend sofort negativ kontrastiert.

2.3. Elektronenmikroskopische Methoden

Ultradünnschnitte : Algenzellen wurden durch die Zugabe von gepuffertem Osmiumtetroxid (Palade 1952) fixiert. Isolierte Chloroplasten wurden im Isolationsmedium mit 4 %igem Glutar-

aldehyd und anschließender Osmiumtetroxid-Nachfixierung behandelt. Eponeinbettung nach Luft (1961), Nachkontrastierung der Schnitte nach Reynolds (1963) oder Venable und Coggeshall (1965). Alle Untersuchungen wurden mehrfach durchgeführt. Kontrollorganismen wurden parallel eingebettet und untersucht. Quantitative Ergebnisse über den Gehalt der Chloroplasten an granaartigen Strukturen wurden mit Hilfe der von Wießner und Amelunxen (1969 b) angewandten Methode zur Auswertung von Photographien von Ultradünnschnitten gewonnen. Die jeweils angegebenen Minimal- und Maximalwerte des prozentualen Anteils an Membranen in Partitionkonfiguration (dort auch als Doppelmembranen bezeichnet) gelten für Stichproben von jeweils 100 ausgezählten Membranen.

Gefrierätzung : Präparationen von isolierten Chloroplasten wurde stufenweise Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 27 % zugesetzt. Anschließend wurden die Proben auf Kupferobjektträgern in Freon eingefroren. Die Gefrierätzung erfolgte nach Moor (1964) und Mühlethaler und Mitarbeitern (1965) in der Ätzanlage der Firma Balzers, Lichtenstein.

Tiefenätzung : Die Chloroplastenpräparationen wurden im Isolationsmedium mit 4 % Glutaraldehyd fixiert (20 min), danach viermal mit aqua bidest. gewaschen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Tiefenätzung bei - 100° C; Dauer der Ätzung 40 - 90 sek .

Negativkontrastierung : Die Thylakoide wurden nach Valentine et al. (1968) auf reinen Kohlefilmen mit 2 %iger neutralisierter Phosphorwolframsäure kontrastiert und sofort elektro-

nenoptisch untersucht.

Elektronenmikroskop : EM 9 a bzw. EM 9 S-2 der Firma Zeiss, Oberkochem, und EM 200 der Firma Philips.

2.4. Analytische Untersuchungsmethoden

Die Chlorophyllbestimmung erfolgte nach Mackinney (1941). Trockengewichte wurden nach Kowallik (1962), der Proteingehalt nach der Mikrokjeldahlmethode bestimmt. Chloroplastenpartikeln wurden durch Ultraschallbehandlung der Algen in einem 0,025 M PO_4-Puffer (pH 8,5) und nachfolgender Zentrifugation (5000 x g, 10 min) gewonnen. Die Absorptionsspektren des Überstandes wurden automatisch bei Raumtemperatur mit einem Unicam SP 1800 Ultraviolet Spectrometer (Messbereich 0 - 1 OD) zwischen 590 und 750 nm registriert. Differenzspektren wurden im Meßbereich 0 - 0,5 OD bei gleicher maximaler Absorption beider Proben gemessen. Die Sauerstoffproduktion wurde polarographisch bei 30° C mit der Clark - Elektrode (Yellow Springs) bei 40 000 lux gemessen. Acetaternährte Algen wurden vor den Messungen mit acetatfreier, CO_2-angereicherter Nährlösung gewaschen und in dieser Lösung für die Messungen suspendiert.

3.1. Die Chloroplastenstruktur von Chlamydobotrys stellata und ihre Regulation

3.1.1. Die Chloroplastenstruktur in Anhängigkeit von der Ernährungsweise

Der Chloroplast des photoheterotroph ernährten Chl. stellata gleicht dem aus autotrophen Zellen in Größe und Membranmenge (Wießner und Amelunxen 1969 a). Er unterscheidet sich aber in der Anordnung der Thylakoide. Bei photoautotrophen Organismen stehen 75 % der Thylakoidmembranen in Kontakt mit benachbarten Membranen und bilden "Doppelmembranen" (Wießner und Amelunxen 1969 a, Tab. 1), wobei lokal Stapel mit granaartigem Aufbau zu erkennen sind (Abb. 1).

Tab. 1. Anteil der in Doppelmembrankonfiguration (Granakonfiguration) verbundenen Thylakoide in v. H. der insgesamt vorhandenen Membranen im Chloroplasten von Chl. stellata in Abhängigkeit von der Ernährungsweise der Organismen (autotroph oder photoheterotroph), sowie nach einem Wechsel in der Art der Kohlenstoffversorgung.

C-Quelle während der Anzucht	C-Quelle nach einem Wechsel in der Ernährungsweise	% Doppelmembranen $\bar{X}$	min	max
Acetat	kein Wechsel	26,4	12,2	29,3
Acetat	CO_2 (6 Std.)*)	69,0	53,6	85,3
CO_2	kein Wechsel	74,4	63,1	84,8
CO_2	Acetat (1 Std.)*)	39,9	33,8	49,4
CO_2	Acetat (2 Std.)*)	32,6	14,6	37,1
CO_2	Acetat (6 Std.)*)	24,6	4,2	41,9

*) Kulturdauer nach einem Wechsel in der Ernährungsweise

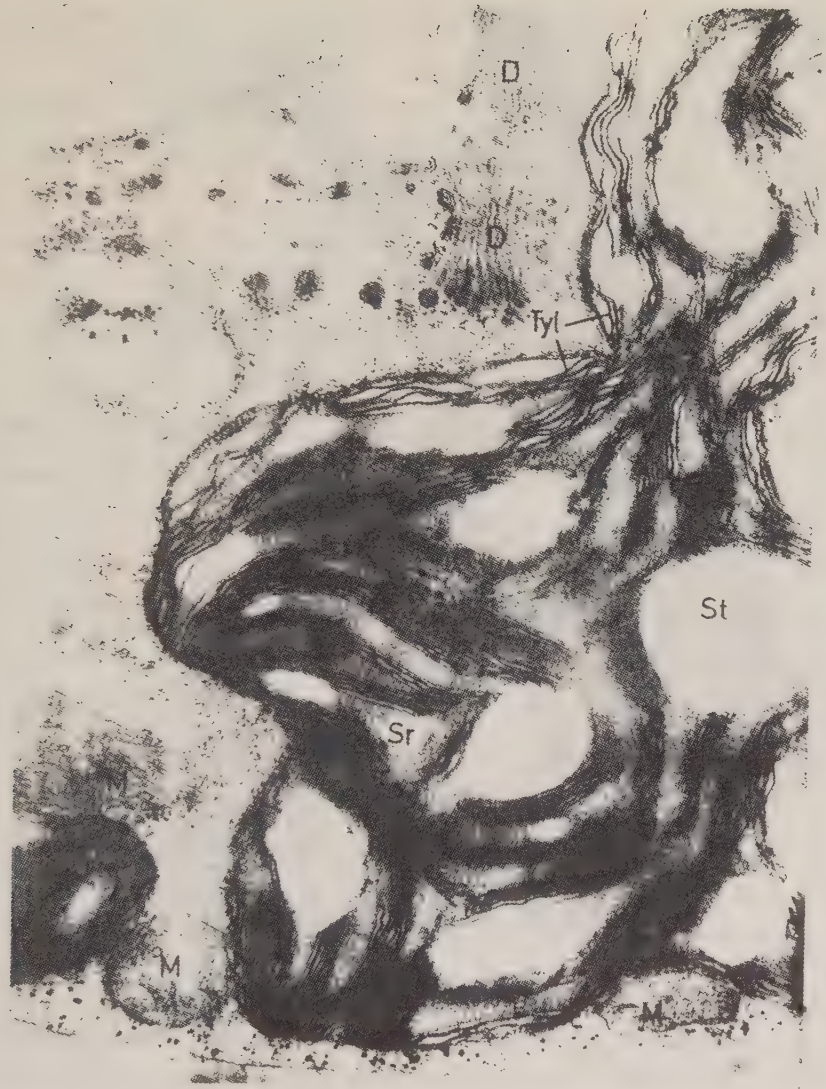


Abb. 1. Ausschnitt aus einer Zelle von Chlamydobotrys stellata. Die Thylakoide sind nach autotropher Ernährung überwiegend in der Partitionkonfiguration und zu relativ kurzen Grana aufgefaltet. 36000:1

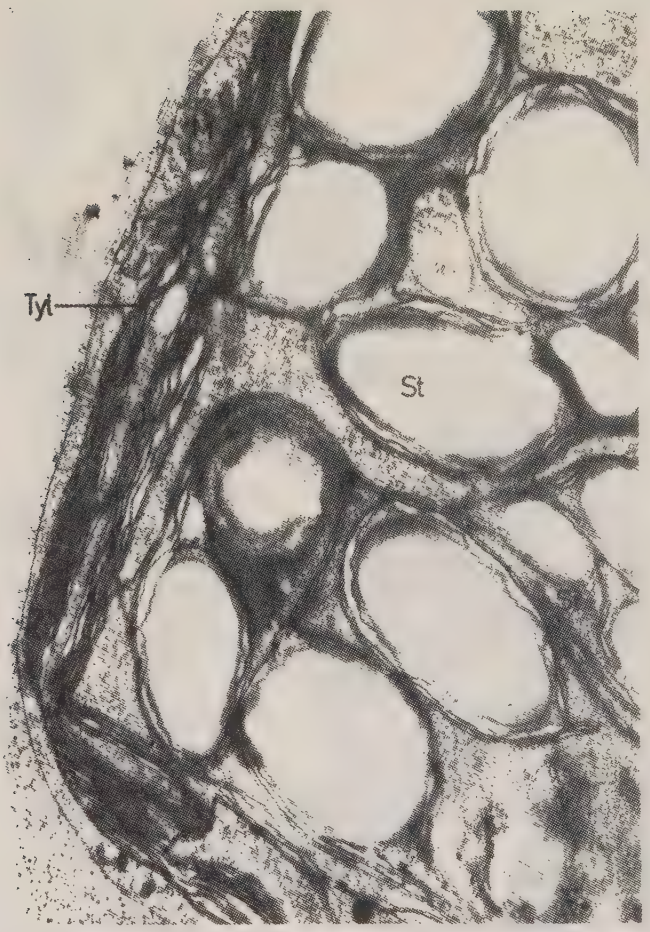


Abb. 2. Ausschnitt aus einer Zelle von Chlamydobotrys stellata nach photcheterotropher Ernährung. Die den Chloroplasten durchziehenden Thylakoide sind deutlich voneinander isoliert. 25000:1

In Chloroplasten aus photoheterotroph angezogenen Algen befinden sich hingegen nur 20 - 25 % der Thylakoidmembranen in einer Doppelmembrankonfiguration. Der weitaus überwiegende Teil der Thylakoidmembranen ist langgestreckt und nicht gepaart (Tab. 1, Abb. 2). Die vollständige physiologische Adaptation des ursprünglich mit Acetat ernährten Chl. stellata an Autotrophie vollzieht sich innerhalb von sechs Stunden. In dieser Zeitspanne wächst der prozentuale Anteil der Doppelmembranen an der gesamten Membranmenge von 25 % auf 70 % an (Wießner und Amelunxen 1969 b, Tab. 1, Abb. 3). Die physiologische Adaptation autotroph gezogener Algen an die Photoheterotrophie ist ebenfalls nach sechs Stunden abgeschlossen (Kapitel 3.3.1.). Die plastidäre Strukturänderung vollzieht sich dagegen in kürzerer Zeit. Schon eine Stunde nach dem Wechsel der Kohlenstoffquelle bilden nur noch ca. 40 % der kontaktnahen Thylakoidmembranen eine Partitionkonfiguration (Tab. 1, Abb. 4) und nach zwei Stunden bietet der Chloroplast bereits das gleiche Bild wie nach sechsstündiger Acetaternährung (Abb. 5 und 6). Bemerkenswert ist, daß dabei nicht nur die kontaktierenden Membranen auseinandergewichen sind, sondern sich auch die ursprünglichen in Grana von 0,5 bis 1,2 µm Länge vereinigten Membranen auseinandergefaltet haben und nun in zwei- bis dreifacher Länge den Chloroplastenraum durchlaufen.

Aus diesem cytologischen Verhalten können folgende Arbeitshypothesen abgeleitet werden :

1. Die schnelle Auflösung des Membrankontaktes bei der Umstellung der mit CO_2 ernährten Chl. stellata auf die Photo-

Abb. 3. Ausschnitt aus einer Zelle von Chlamydobotrys stellata nach einer sechsstündigen Adaptation von photoheterotropher an autotrophe Ernährungsweise. Der überwiegende Teil der Thylakoidmembranen befinden sich in Kontakt miteinander und bilden Grana, die aus wenigen übereinander gestapelten Membranen bestehen. Zw Zellwand; P Plasmalemma; A Augenfleck. 30000 : 1

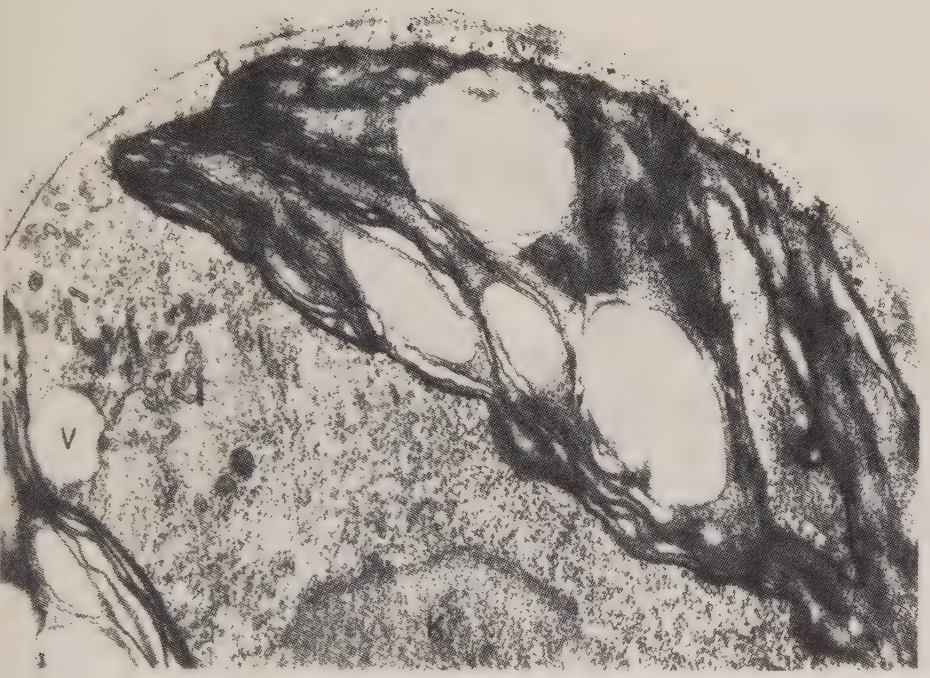


Abb. 4. Ausschnitt aus der Zelle eines ursprünglich autotroph gezogenen und anschließend eine Stunde mit Acetat aber ohne CO_2 gehaltenen Chlamydobotrys stellata. Die meisten Membranen sind durch eine Stromaschicht voneinander getrennt. V Vakuole; K Kern. 32000 : 1

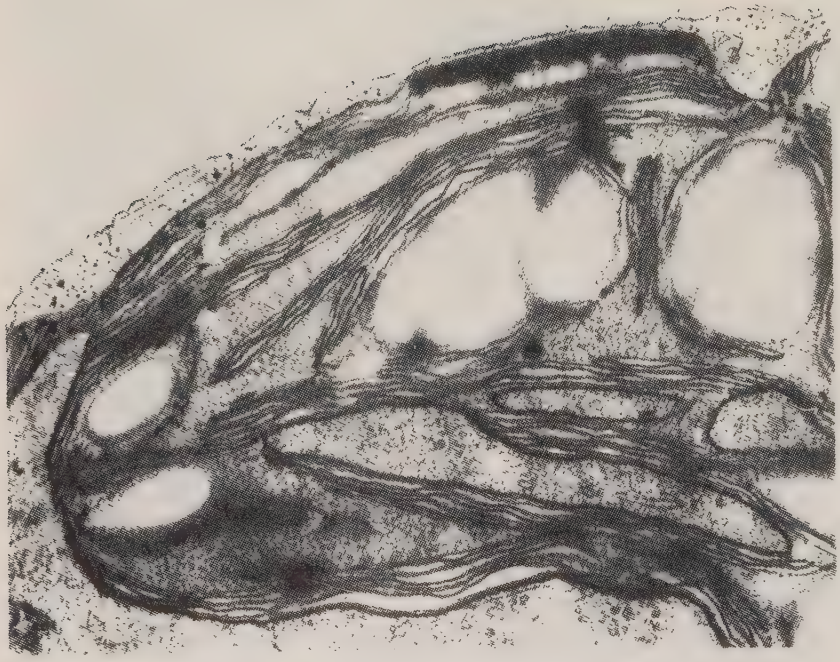


Abb. 5. Ausschnitt aus der Zelle eines ursprünglich autotroph gezogenen Chlamydobotrys stellata mit Augenfleck (A) zwei Stunden nach einem Wechsel zu photoheterotropher Ernährung. Die ursprüngliche Partitionkonfiguration hat sich aufgelöst. 33000 : 1

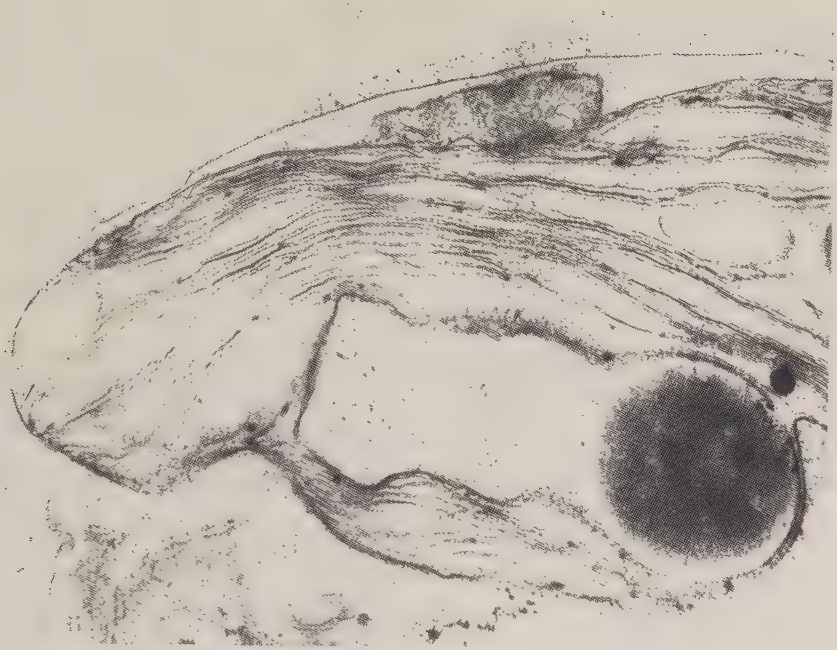


Abb. 6. Ausschnitt aus der Zelle eines ursprünglich autotroph angezogenen Chlamydobotrys stellata sechs Stunden nach einem Wechsel zu photoheterotropher Ernährung. Die ursprüngliche Partitionkonfiguration hat sich aufgelöst. 38000 : 1

heterotrophie geht auf Ladungsänderungen an der Membran zurück, deren Ursache Änderungen im Anspruch an den photosynthetischen Elektronentransport sind, und die das "Koppelungsvermögen" zwischen benachbarten Thylakoidmembranen beeinflußt.

2. Vorrausetzung für die Granabildung ist eine besondere thylakiodale Strukturkomponente ("stacking"-Komponente). Diese fehlt den isolierten Thylakoiden der photoheterotroph ernährten Chl. stellata. Zu dieser Annahme berechtigen die Befunde von Wießner und Amelunxen (1969 b), nach denen die Bildung von Doppelmembranen bei der Umstellung auf autotrophe Ernährungsweise (im Gegensatz zu der von mir festgestellten Auflösung der Doppelmembrankonfiguration bei einem Übergang zur Photoheterotrophie) adaptiv verläuft.

3. Treffen 1. und 2. zu, so sollten die Thylakoidmembranen der kurzfristig (1 bis 2 Stunden) auf Photoheterotrophie umgestellten Chl. stellata trotz der in vivo auseinandergewichenen Membranen die strukturelle "stacking"-Komponente noch besitzen.

Die bei der experimentellen Überprüfung dieser drei Hypothesen erzielten Ergebnisse werden im nächsten Kapitel vorgestellt.

3.1.2. Die Wirkung von Magnesiumionen auf die thylakoidale Struktur isolierter Chloroplasten

Der Zusatz von Salzen zweiwertiger Kationen führt in vitro zur Rekombination von Doppelmembranen ("stacking") zwischen zuvor experimentell getrennten Thylakoiden (Izawa und Good 1966, Jacobi und Lehmann 1968, Goodenough und Staehelin 1971). Ihre Ursache ist wahrscheinlich eine polare Verknüpfung über besondere thylakoidale Strukturkomponenten. Zur Überprüfung der im vorhergehenden Kapitel aufgeführten Arbeitshypothesen habe ich daher untersucht, ob Mg^{2+}-Ionen auch bei Chl. stellata isolierte Thylakoide miteinander verbinden können. Hierzu wurden die isolierten Thylakoide einer relativ hohen Konzentration von 20 mM Mg^{2+} ausgesetzt. Die Ergebnisse faßt die Tabelle 2 zusammen.

Tab. 2. Die Wirkung von Mg^{2+}-Ionen (20 mM) auf den Anteil der in Doppelmembrankonfiguration verbundenen Thylakoide, Angaben in v. H. der insgesamt festgestellten Membranmenge isolierter Chloroplastenfragmente von Chl. stellata, nach Anzucht mit Acetat oder CO_2, sowie nach einem Wechsel in der Art der Kohlenstoffquelle.

C-Quelle während der Anzucht	C-Quelle nach einem Wechsel in der Ernährungsweise	% Doppelmembranen in Chloroplasten intakter Zellen	in isolierten Chloroplasten + Mg^{2+}		
		$\bar{X}$	$\bar{X}$	min	max
Acetat	kein Wechsel	26,4	26,0	5,6	37,1
CO_2	kein Wechsel	74,4	61,9	46,4	90,1
CO_2	Acetat (2 Std.)x)	32,6	60,2	51,0	71,1

x) Kulturdauer nach einem Wechsel in der Ernährungsweise

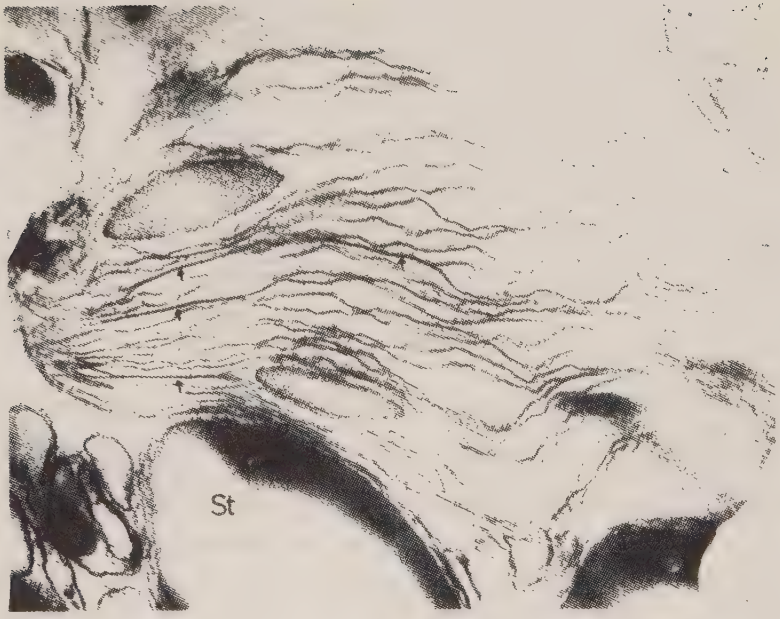


Abb. 7. Aus photoheterotroph gezogenen Chlamydobotrys stellata isolierte Thylakoidmembranen in Mg^{2+}-haltigem Medium. Die Thylakoide sind überwiegend ohne Membrankontakt. Vereinzelt vorkommende"Partitions" sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. 54000:1

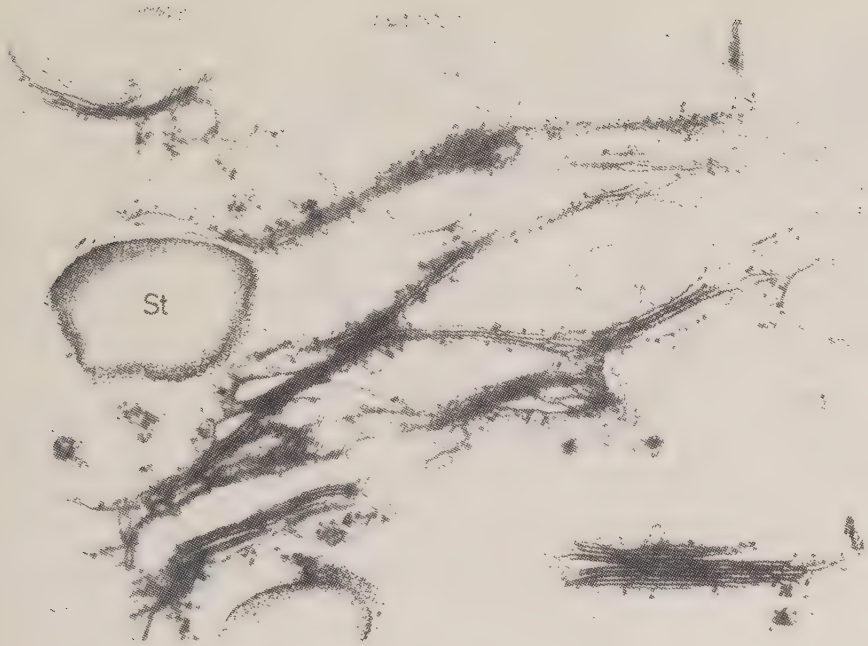


Abb. 8. Isolierte Thylakoidmembranen aus autotroph gezogenen Chlamydobotrys stellata in Mg^{2+}-haltigem Medium. Die Thylakoide behalten ihre Granakonfiguration in vitro bei, obwohl die Chloroplastenhülle fehlt und Stromakomponenten ausgewaschen worden sind. 48000:1

Abb. 9. Isolierte Chloroplastenmembranen von autotroph kultiviertem Chlamydobotrys stellata, der zwei Stunden mit Acetat und ohne CO_2 gehalten wurde, in Mg^{2+}-haltigem Medium. Die bei diesem ernährungsphysiologischen Typ in vivo getrennten Membranen haben sich wieder zu Doppelmembranen zusammengelagert. 79000 : 1

Die Tabelle zeigt, daß das Verhältnis von Doppelmembranen zu Einzelmembranen in den Chloroplasten aus photoheterotroph kultivierten Algen durch eine Mg^{2+}- Behandlung nicht verändert wird (vgl. auch Abb. 7); Mg^{2+} kann somit eine Verknüpfung von Thylakoidmembranen in photoheterotroph kultivierten Chl. stellata nicht herbeiführen.

(Erwartungsgemäß ist die Thylakoidanordnung in isolierten Chloroplasten von autotrophen Chl. stellata gegen die Zugabe von Mg^{2+}-Ionen unempfindlich; denn der Anteil an Grana entspricht im wesentlichen demjenigen in intakten Kontrollorganismen [Tab. 2, Abb. 8] . Die geringfügige Abnahme im Anteil der Doppelmembranen von 10 % dürfte auf den Isolationsvorgang zurückzuführen sein.)

Im deutlichen Gegensatz zu den mit photoheterotrophen Kulturen erzielten Ergebnissen steht das Verhalten der Thylakoidmembranen autotroph vorkultivierter und anschließend zwei Stunden mit Acetat ernährter Algen : Mg^{2+}-Ionen fügen im Chloroplastenpräparat die bei den Kontrollorganismen (vgl. Tab. 1 und Abb. 4) bereits getrennten, langgestreckten Einzelmembranen wieder zu Stapeln aus Doppelmembranen zusammen (Abb.9).

Die Thylakoidmembranen reagieren somit in Abhängigkeit von der Ernährungsweise und der Dauer der Ernährung unterschiedlich auf Mg^{2+}-Ionen. Diese Ergebnisse stützen die oben dargestellte Arbeitshypothese, daß den mit Acetat ernährten Algen offensichtlich ein Strukturfaktor fehlt oder dieser maskiert vorliegt, sodaß Mg^{2+}-Ionen keine strukturelle Verbindung zwischen Thylakoiden herstellen können. Ursprünglich autotrophe Chl. stellata hingegen besitzen diesen Faktor auch dann

noch, wenn als Folge einer vorübergehenden kurzfristigen Änderung in der Ernährungsweise die Membranen in vivo auseinandergewichen sind.

Damit stellt sich die Frage, ob diese Strukturkomponente als Struktureinheit elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden kann.

3.1.3. Die nach Gefrierätzung isolierter Chloroplasten sichtbare Membranstruktur

Entgegen der gelegentlich in älterer Literatur geäußerten Ansicht, daß die Gefrierätzung Membranoberflächen sichtbar macht, werden nach Branton (1966), Branton und Park (1967), Meyer und Winkelmann (1969), Park und Pfeifhofer (1969), Wehrli et al. (1970), Tillack und Marchesi (1970) und Chalcroft und Bullivant (1970) Membranen beim Gefrierbruch aufgespalten, und zwar entlang hydrophober Bindungen innerhalb der Membran, wodurch ihre innere Struktur sichtbar wird. Auf den Bruchflächen sind bei den meisten Membranarten Partikeln zu erkennen, die Proteine (Sitte 1969, Moor 1969, Meyer und Winkelmann 1969) oder Lipid-Protein-Komplexe (Tillack und Marchesi 1970, Bullivant 1973) sein sollen.

(Zur Präparationstechnik ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen, daß Chl. stellata - wie Euglena viridis und Amphidinium elegans [Moor 1966] - kein Glycerin aufnimmt, das normalerweise zur Verhinderung von Eiskristallbildung den Präparationen vor dem Einfrieren zugesetzt werden muß [Moor 1964, Richter 1968]. Da die Organismen jedoch schon bei einer Konzentration von 1,5 - 2 % Glycerin sterben, mußte bei der Gefrierätzung nicht mit intakten Zellen, sondern mit isolierten Chloroplasten gearbeitet werden. Dieser mehodische Ausweg war möglich , weil das Isolierungsverfahren zur Gewinnung von Chloroplasten das Verhältnis von Doppelmembranen zu Einzelmembranen [siehe oben] nicht ändert.)

Die photographischen Aufnahmen von quergebrochenen und gefriergeätzten Chloroplastenfragmenten bestätigen zunächst die bereits an Hand von Ultradünnschnitten festgestellte Tatsache, daß die Thylakoide nach autotropher Anzucht gepaart sind, nach

photoheterotropher Kultur aber vorwiegend langgestreckt und voneinander getrennt sind (Abb. 10). Im Inneren der Chloroplastenmembran sind zwei verschieden strukturierte komplementäre Bruchflächen sichtbar. Die Bruchfläche B (Nomenklatur nach Branton und Park 1967 und Park und Pfeifhofer 1969) erscheint als relativ einheitliche (smooth) Fläche, auf der Partikeln zu erkennen sind (Abb. 11). Sie entsprechen den die Chloroplastenmembranen höherer Pflanzen und Grünalgen kennzeichnenden sogenannten 175 Å-Partikeln. Die Partikeln von Chl. stellata sind, wie auch für Chlamydomonas (Goodenough und Staehelin 1971) und Oocystis (Pendland und Aldrich 1973) beschrieben, in ihren Maßen nicht einheitlich. Für Chl. stellata liegt die durchschnittliche Größe bei 160 Å. Sie entspricht damit den bei Chlamydomonas reinhardi (Goodenough und Staehelin 1971) und Euglena gracilis (Ophir und Ben-Shaul 1973) ermittelten Maßen. An einigen Bruchflächen sind vereinzelt Vertiefungen zu erkennen, aus denen die Partikeln offensichtlich herausgebrochen sind.

Die Bruchfläche C ist dicht mit kleineren Partikeln besetzt, deren durchschnittliche Breite (wie auch für andere Organismen in der Literatur beschrieben) 110 Å beträgt. Diese Bruchfläche C ist die komplementäre Seite zu Bruchfläche B. Besonders deutlich ist dies auf der Abbildung 12 zu sehen. Hier wurden - bei verändertem Bedampfungswinkel und günstiger Bedampfungsmenge - die entsprechenden Leerstellen, in denen vor der Spaltung der Membran die 160 Å-Partikeln lokalisiert waren, abgebildet.

Abb.10. Gefriergeätzte Thylakoide aus isolierten Chloroplasten photoheterotroph angezogener Chlamydobotrys stellata. Wenige Doppelmembranen (DM), vereinzelte Stärkekörner (St) und die den Hauptanteil an Membranen ausmachenden Einzelmembranen (EM) sind quergebrochen. Die Einzelmembranen sind jeweils zu Paaren geordnet, berühren einander aber nicht. Der Zwischenraum, das Thylakoidlumen,scheint stärker ätzbar zu sein als der Stromabereich. Der Pfeil deutet die Bedampfungsrichtung an.

Abb. 11. Gefriergeätzte, isolierte Chloroplasten von autotroph angezogenem Chlamydobotrys stellata. Die Membranbruchflächen C und B alternieren. Die Partikeln auf der Bruchfläche B treten zum Teil gruppiert auf. Mit höheren bzw. niedrigeren Partikelndichten besetzte großflächige Abschnitte treten auf der Bruchfläche B aber nicht auf. 98000 : 1

Abb. 12. Gefriergeätzte Thylakoide von Chlamydobotrys stellata. Die Abbildung zeigt C-Bruchflächen, die mit Partikeln dicht besetzt sind. Zwischen den Partikeln sind Leerstellen zu erkennen, die von einem Kranz von Partikeln umgeben sind. Einige Leerstellen wurden durch Kreise markiert. 115000 : 1

Die Bruchfläche B ist regelmäßig dem Thylakoidlumen zugekehrt, die Fläche C dem Stroma - und damit auch den Zonen des Membrankontaktes, den sogenannten "partitions" (Abb. 13). Beim Bruch durch einen Thylakoidstapel alternieren stets die beiden Bruchflächen (Abb. 13, 14,15). Diese Befunde sprechen für einen asymmetrischen Membranaufbau, bei dem die 160 Å-Partikeln dem Lumen und die 110 Å-Partikeln dem Stroma zugewandt sind.

Zur genaueren Charakterisierung der Thylakoide aus Chloroplasten von Acetat- bzw. CO_2-ernährten Chl. stellata wurde die mengenmäßige Verteilung der Partikeln auf den Membranbruchflächen ermittelt. Tabelle 3 gibt die auf 0,01 μ^2 Fläche berechnete Partikelnzahl wieder.

Tab. 3. Die Verteilung der 110 Å-Partikeln und der 160 Å-Partikeln in gefriergeätzten Thylakoidmembranen von Chl. stellata nach photoheterotropher und autotropher Anzucht, bezogen auf eine Fläche von 0,01 μ^2, sowie das Verhältnis von 110 Å-Partikeln zu 160 Å-Partikeln.

C-Quelle während der Anzucht	Anzahl an 110 Å-Partikeln pro 0,01 μ^2		Anzahl an 160 Å-Partikeln pro 0,01 μ^2		110 Å-Partikeln / 160 Å-Partikeln
	$\bar{X}$	% S	$\bar{X}$	% S	
Acetat	34,64	13,7	8,38	14,9	4,14 : 1
CO_2	33,20	22,3	8,12	28,9	4,09 : 1

Die Bruchfläche C ist durchschnittlich mit ca. 34 der 110 Å-Partikeln / 0,01 μ^2 besetzt. Die Bruchfläche B zeigt durchschnittlich nur acht der 160 Å-Partikeln / 0,01 μ^2. Die Partikelnbesetzung streut für beide Partikelnarten nach Acetat-

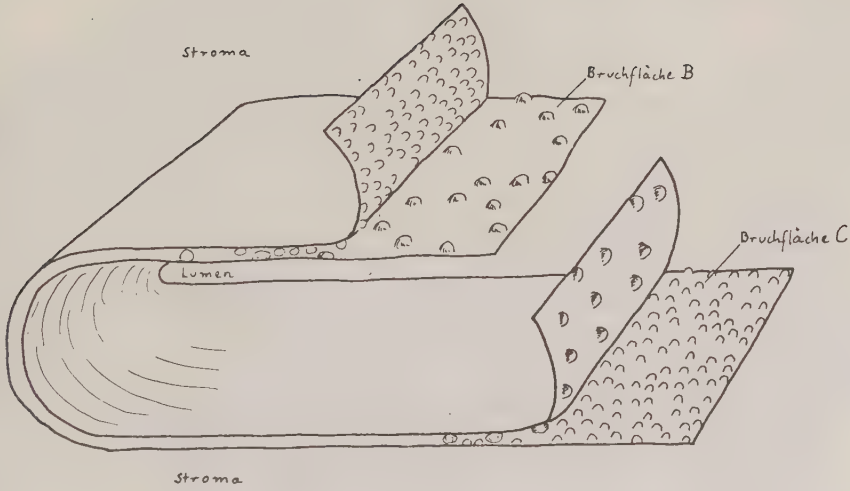


Abb. 13. Schematische Wiedergabe eines Thylakoidabschnittes aus Chl. stellata. Sie zeigt die durch Gefrierbruch freigelegten Membranbruchflächen B und C, sowie ihre Orientierung zum Stroma und zum Lumen.

Abb. 14. Gefriergeätzte, isolierte Chloroplasten aus autotroph angezogenem Chlamydobotrys stellata. Die Membranbruchfläche B ist mit vereinzelten großen Partikeln, die Bruchfläche C dagegen dicht mit kleineren Partikeln besetzt. 82000 : 1

Abb.15. Gefriergeätzte, isolierte Thylakoide von photoheterotroph angezogenen Chlamydobotrys stellata. Membranbruchfläche B weist neben Partikeln auch zahlreiche kleine Vertiefungen auf, die den Partikeln der anderen, durch den Bruch entfernten Membranhälfte (C), zugeordnet werden können. 72000:1

ernährung um etwa 14 %. Bei autotrophen Algen ist die Streuung größer und liegt zwischen 20 und 30 %. Die Streuungsangabe bezieht sich auf ausgewertete Bildabschnitte von mehreren, verschiedenen Photographien.

Somit ist festzustellen, daß die Größe und Verteilung der Partikeln in den Thylakoidmembranen unabhängig von der Ernährungsweise von Chl. stellata ist (vgl. auch Abb. 14 und 15). Sowohl nach autotropher als auch nach photoheterotropher Ernährung liegen kleine und große Partikeln in einem Verhältnis von 4 : 1 vor. Die innere Thylakoidstruktur von Chl. stellata unterscheidet sich damit deutlich von der in höheren Pflanzen und in den bislang bearbeiteten Grünalgen festgestellten Thylakoidmembranen, bei denen regelmäßig für die Bruchfläche B höhere Partikelndichten gemessen wurden (Branton 1969, Guérin-Dumartrait und Moyse 1970, Guérin-Dumartrait et al. 1970). Einige Autoren stellten zudem eine unterschiedliche Verteilung der großen Partikeln in Anhängigkeit von der Zuordnung der Membranbruchfläche zum Grana- oder Intergranabereich fest (Remy 1969, Phung Nhu Hung et al. 1970, Sane et al. 1970, Goodenough und Staehelin 1971). Eigene Nachmessungen an veröffentlichten Bildern anderer Autoren ergaben für den Granabereich Verhältnisse von 1,5 : 1 bis 2,5 : 1 und für den Intergranabereich, wegen der geringen Zahl an 160 - 180 Å großen Partikeln, ein Verhältnis von 6 : 1 bis 10 : 1.

Goodenough und Staehelin (1971) vermuten, daß zwischen Partikelndichte und dem "stacking" eine direkte Beziehung besteht.

a

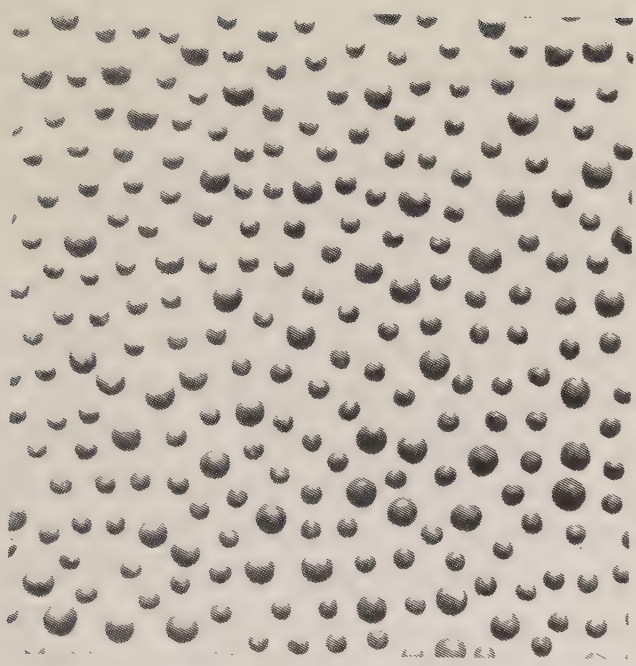


Abb. 16. Anordnung von großen und kleinen Partikeln in der Thylakoidmembran von Chlamydobotrys stellata.
a) Aufsicht
b) in einem Winkel von 60° betrachtet.

Die von mir für Chl. stellata erzielten Ergebnisse stehen hierzu aber im Widerspruch. In diesem Organismus tritt in den in Grana vereinigten Doppelmembranen der autotrophen Zellen keine dichtere Partikelnanordnung als in den Membranen des Intergranabereiches auf.

Meine Ergebnisse habe ich in der Abbildung 16 wiedergegebenen Rekonstruktion der Anordnung von 160 Å-Partikeln und 110 Å-Partikeln in Thylakoidmembranen von Chl. stellata zusammengefaßt. Den Ausgang für dieses Modell bildete die Photographie einer B-Bruchfläche. Die 110 Å-Partikeln wurden um die 160 Å-Partikeln in dem in Tabelle 3 angegebenen Verhältnis von 4 : 1 gruppiert. (Die Größe der Partikeln wurde um eine geschätzte Bedampfungsdicke reduziert.) Es zeigt sich, daß die größeren Partikeln jeweils von 4 bis 7 kleineren Partikeln umgeben sind.

3.1.4. Die im Negativkontrastverfahren erkennbare Struktur der Thylakoidoberflächen

Nach Negativkontrastierung sind auf den Oberflächen isolierter Thylakoide in der Regel Partikeln zu erkennen, deren Größe für Spinatchloroplasten durchweg mit 80 - 100 Å angegeben wird (Howell und Moudrianakis 1967, Murakami 1968, Park und Pfeifhofer 1967). Nach Untersuchungen von Howell und Moudrianakis und von Murakami besitzen sie eine Ca^{2+}-abhängige ATPaseaktivität und können mit Hilfe von EDTA quantitativ von der Membran entfernt werden. Daneben soll noch ein anderer bekannter Partikelntyp den Thylakoiden aufsitzen, die Carboxydismutase (Arntzen et al. 1969, Kreutz 1969).

(Zur Methode und zur Auswertung der im folgenden vorgestellten Abbildungen ist zu sagen, daß die Partikeln auf der Thylakoidoberfläche in ein und demselben Präparat je nach Kontrastierung unterschiedlich sichtbar sind und daß bei übereinanderliegenden Membranen oft auch die Partikeln der tieferliegenden Membranen abgebildet werden. Ein Vergleich der Oberflächen von Thylakoiden aus mit CO_2 und mit Acetat ernährten Algen kann sich daher nur auf qualitative Angaben stützen.)

Bei beiden Membrantypen treten in etwa gleichem Maße höhere und niedrigere Verteilungsdichten der Partikeln auf. In beiden Fällen ist auch die maximale Anzahl an Partikeln pro Fläche gleich groß. Die Partikeln sind mit 1 mM EDTA sowohl nach kurzfristiger als auch nach bis zu 24-stündiger EDTA-Einwirkung nicht abwaschbar (Abb. 17 a und b, Abb. 18 a und b). Zur Kontrolle, ob die von mir eingesetzten EDTA-Mengen und die Zeitdauer bei anderen Objekten ausreichen, wurden Spinatchloro-

a

b

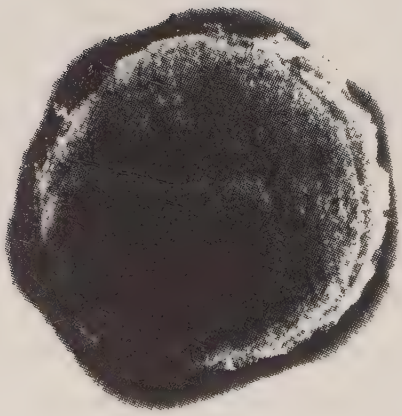
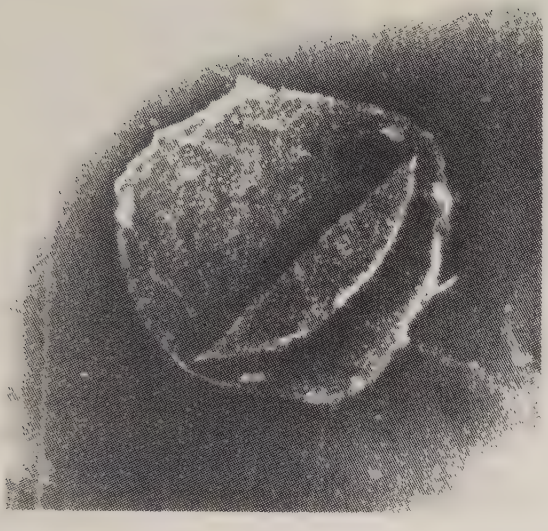


Abb.17. a) Negativ kontrastierte Thylakoide aus Chloroplasten autotroph ernährter Chlamydobotrys stellata. Die Membranen sind dicht mit Partikeln besetzt. 56000:1
b) wie a), jedoch nach dreimaligem Waschen mit 1 mM EDTA. Die Partikeln konnten von den Membranen nicht entfernt werden. 56000:1

a



b

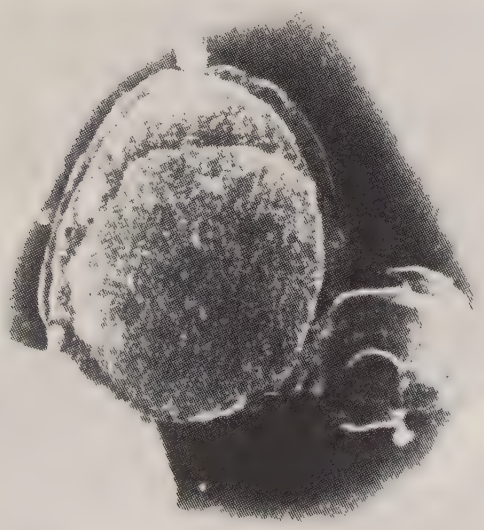
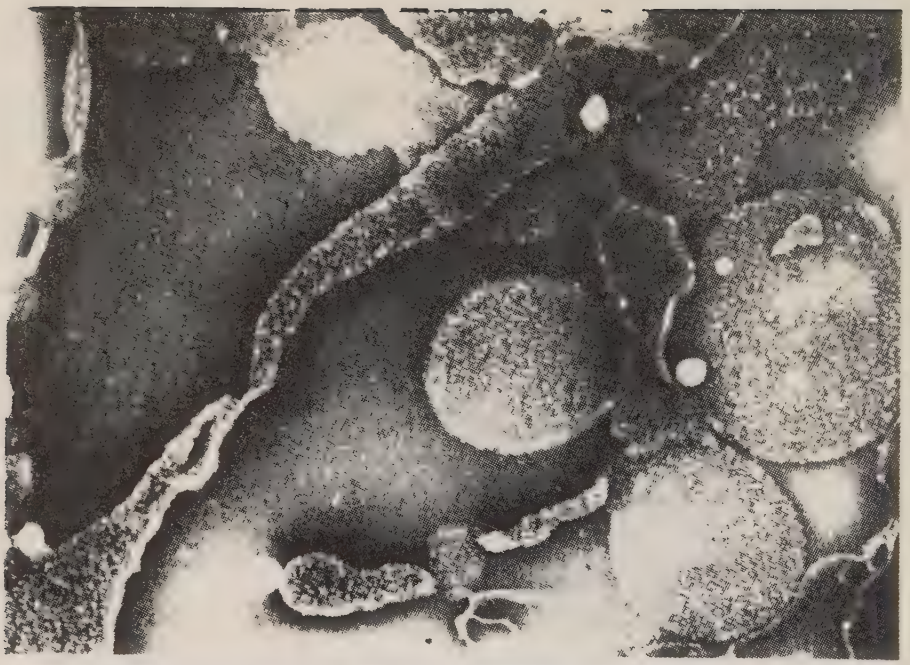


Abb.18. a) Negativ kontrastierte Thylakoide aus Chloroplasten photoheterotroph ernährter Chlamydobotrys stellata. Die Membranen sind dicht mit Partikeln besetzt. 56000:1
b) wie a), jedoch nach dreimaligem Waschen mit 1 mM EDTA. Die Partikeln konnten von den Membranen nicht entfernt werden. 56000:1

a



b

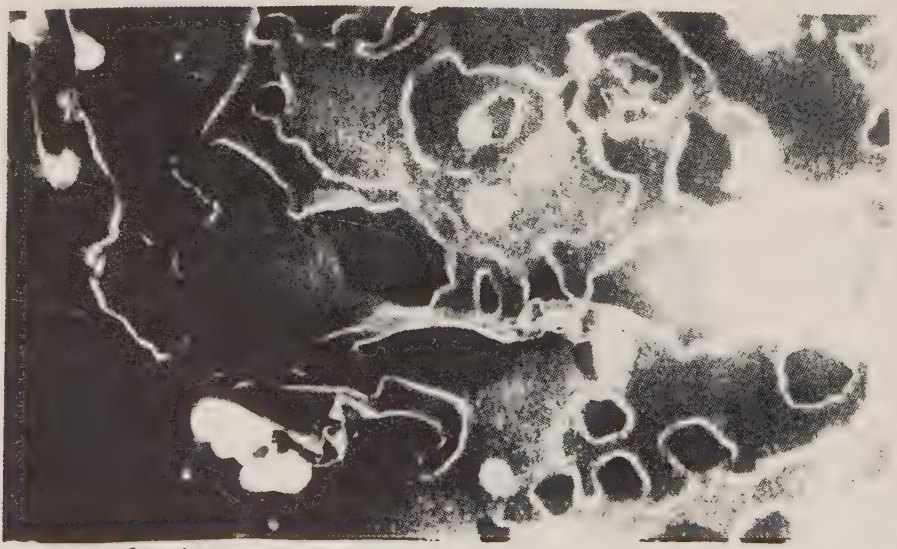


Abb.19. a) Negativ kontrastierte Thylakoide aus Chloroplasten von Spinat. Die Membranen sind dicht mit Partikeln besetzt. 46000:1

b) wie a), jedoch nach dreimaligem Waschen mit 1 mM EDTA. Die Partikeln konnten nahezu vollständig von den Membranen entfernt werden. 53000:1

plasten derselben Behandlung wie die Chloroplasten von Chl. stellata unterworfen. Hier konnten die Partikeln quantitativ entfernt werden : Nach EDTA-Behandlung sind nur noch vereinzelte, abgewaschene Partikeln gleichmäßig über die Membran und den Trägerfilm verstreut (Abb. 19 a und b).

Demnach sind die Oberflächenpartikeln der Thylakoide in Chloroplasten von Spinat und von Chlamydobotrys stellata unterschiedlich fest an die Membran gebunden. Unterschiede treten aber auch hinsichtlich der elektronenmikroskopischen Gestalt der Partikeln auf. Bei Chl. stellata heben sich die Partikeln weniger stark von der Membran ab, als es bei den distinkten Partikeln des Spinatthylakoids der Fall ist. Sie sind ferner mit 110 Å etwa 10 % größer als die ebenfalls vermessenen Partikeln (100 Å) von Spinatthylakoiden. Die Frage, ob die oberflächengebundenen Partikeln bei Chl. stellata außerdem anders zusammengesetzt, flacher oder tiefer in die Membran eingebettet sind, läßt sich noch nicht entscheiden, aber doch vermuten. Solange die Partikeln noch nicht isoliert und gereinigt und ihnen biochemische Aktivitäten zugeordnet werden können, muß die endgültige Beantwortung dieser Frage allerdings aufgeschoben bleiben.

3.1.5. Die nach Tiefenätzung sichtbare Struktur der Thylakoidoberflächen

Objekte, wie z.B. Thylakoidmembranen, deren Oberflächen durch Tiefenätzung dargestellt werden sollen, müssen zuvor in reines Wasser überführt werden, da bei der Ätzung reines Wasser am schnellsten sublimiert wird. Andererseits werden in hypotonischem Medium leicht Enzyme aus Chloroplasten ausgewaschen (Howell und Moudrianakis 1967, Strotmann und Mitarbeiter 1973), was zu Veränderungen der natürlichen Thylakoidstruktur führen kann. Als methodischer Ausweg wurde daher die unmittelbare Fixierung der isolierten Thylakoide im Isolationsmedium mit Glutaraldehyd und ein anschließendes mehrfaches Waschen mit aqua bidest. gewählt. Denn nach Angaben in der Literatur sollen vorfixierte Objekte nach Gefrierätzung nicht von unfixierten zu unterscheiden sein (Tillack und Marchesi 1970, Moor und Matile 1970, Meyer und Winkelmann 1970, Chalcroft und Bullivant 1970, Bullivant 1973). Meine eigenen Befunde, wie auch die von Park und Branton (1967) und Fineran (1970) weisen allerdings darauf hin, daß die Vorfixierung mit Glutaraldehyd die Brucheigenschaften der Membran verändert. Doch wurde dies in Kauf genommen und für die hier angestrebten Untersuchungen der Oberflächen eine Vorfixierung als vertretbar angesehen.

(Wie die Abbildung 20 zeigt, treten die bei Gefrierätzpräparaten [vgl. Abb. 14 und 15] bekannten Bruchflächen nach Vorfixierung hier nicht in Erscheinung, obwohl Partikeln dargestellt werden. Möglicherweise verknüpft Glutaraldehyd, das speziell mit Proteinen reagieren soll, proteinöse Membrankomponenten - deren Anteil im Vergleich zu anderen Mem-

Abb. 20. Tiefengeätzte Thylakoide aus isolierten und Glutaraldehyd-fixierten Chloroplasten von Chlamydobotrys stellata. Der Gefrierbruch folgt nicht mehr Membranflächen. Die verschiedenen Partikelntypen erscheinen hier auf einer Bruchebene. 51000:1

a

b

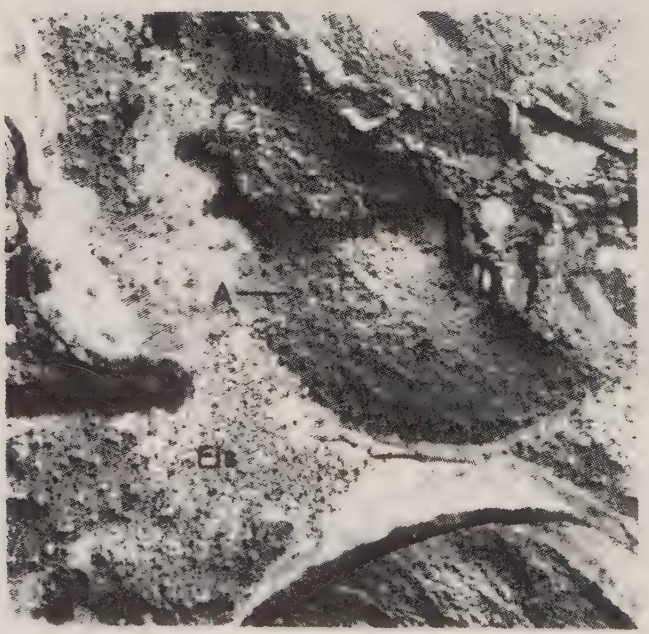


Abb.21.a) Tiefengeätzte Thylakoide aus isolierten Chloroplasten von photoheterotroph angezogenem Chlamydobotrys stellata. Die Membranoberfläche (A) weist flache, unregelmäßige Erhebungen auf. 81000:1

b) Wie a), jedoch aus autotrophen Algen. 87000:1

brantypen im Thyalokoiden besonders hoch ist - sodaß der Bruch nicht mehr entlang denselben Grenzen wie bei unfixierten Objekten erfolgt. Dieser Befund rechtfertigt ferner die Annahme, daß nicht-partikular darstellbare Proteinkomponenten den Lipidfilm durchdringen.)

Sowohl nach einer Kultur mit Acetat als auch nach autotropher Ernährung zeigen sich bei der Tiefenätzung keine Unterschiede in der Struktur der Membranoberfläche. Unterschiedlich strukturierte Oberflächen - die eventuell speziell dem Grana- oder dem Intergranabereich angehören könnten - wurden nicht festgestellt. In den Abbildungen 21 a und 21 b sind Oberflächenabbildungen von mit Acetat- bzw. CO_2-ernährten Organismen wiedergegeben. Die äußere Oberfläche zeigt in Übereinstimmung mit den Beobachtungen an negativkontrastierten Thylakoiden eine nur flache, schwache Strukturierung. Die Oberfläche ist damit zwar den Oberflächen von Chloroplastenmembranen des Spinat (Park und Shumway 1968) ähnlich, aber nicht gleich, Diese Befunde zeigen ferner, daß die strukturelle "stacking"-Komponente in einer elektronenmikroskopisch nicht mehr erfaßbaren Größenordnung liegt.

3.1.6. Die Chloroplastenstruktur nach einem Wechsel der Ernährungsbedingungen in Gegenwart von Hemmstoffen der Proteinsynthese

Die in Kapitel 3.1.1 und 3.1.2. beschriebenen Ergebnisse lassen die Annahme zu, daß während der Adaptation der mit Acetat kultivierten Chl. stellata an die Autotrophie der für die Bildung von Grana erforderliche strukturelle Faktor in die Chloroplastenmembran eingebaut wird. Wenn er Proteincharakter hat oder mittels neugebildeter Enzyme entsteht, dann sollten Hemmstoffe der Proteinsynthese seine Entstehung während der sechsstündigen Adaptationsphase und damit die Entwicklung von Grana unterdrücken. Als solche Hemmstoffe kommen das Chloramphenicol und das Cycloheximid in Frage. Chloramphenicol verhindert die Proteinsynthese an den plastidären 70 S Ribosomen; Cycloheximid ist ein spezifischer Hemmstoff der Proteinsynthese an den cytoplasmatischen 80 S Ribosomen von Eucaryonten (Hartmann et al. 1968, Hoober et al. 1969, Reger et al. 1970).

Adaptation von der Photoheterotrophie an die Autotrophie :
Bei Chl. stellata hemmt Chloramphenicol nur partiell die physiologische Adaptation an die Autotrophie, verhindert jedoch völlig das Wachstum (vgl. Kapitel 3.3.2.). In ihrer Granastruktur entsprechen die ernährungsphysiologisch umgestellten und mit Chloramphenicol behandelten Algen fast vollständig den unvergifteten Kontrollzellen (Tab. 4, Abb. 22). Damit ist bewiesen, daß zur "Fusion" von einzelnen Thylakoiden zu Doppelmembranen keine plastidäre Proteinsynthese notwendig ist.

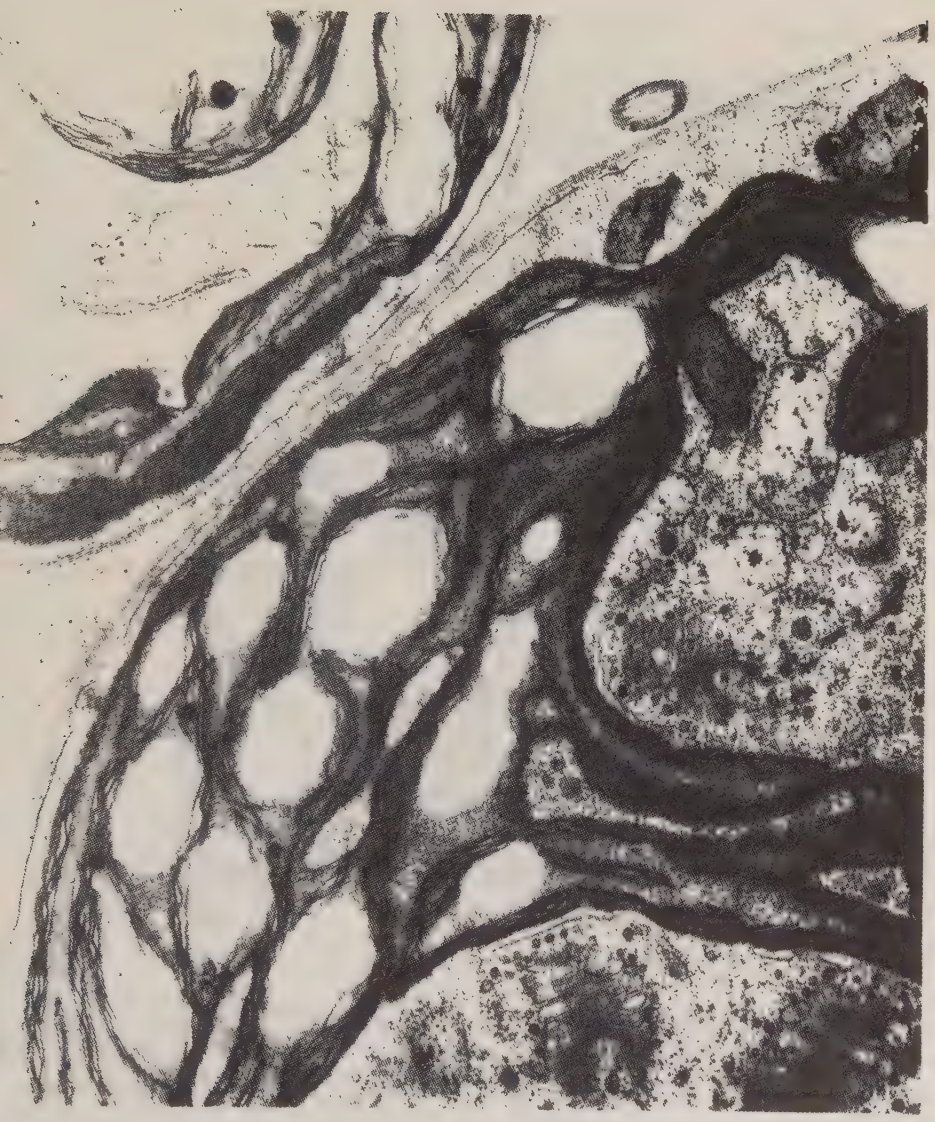


Abb.22. Ausschnitt aus einer Zelle von Chlamydobotrys stellata nach sechsstündiger Adaptationszeit von photoheterotropher an autotrophe Ernährungsweise in Gegenwart von Chloramphenicol. Der überwiegende Teil der Thylakoidmembranen bildet "Partitions". 26000:1

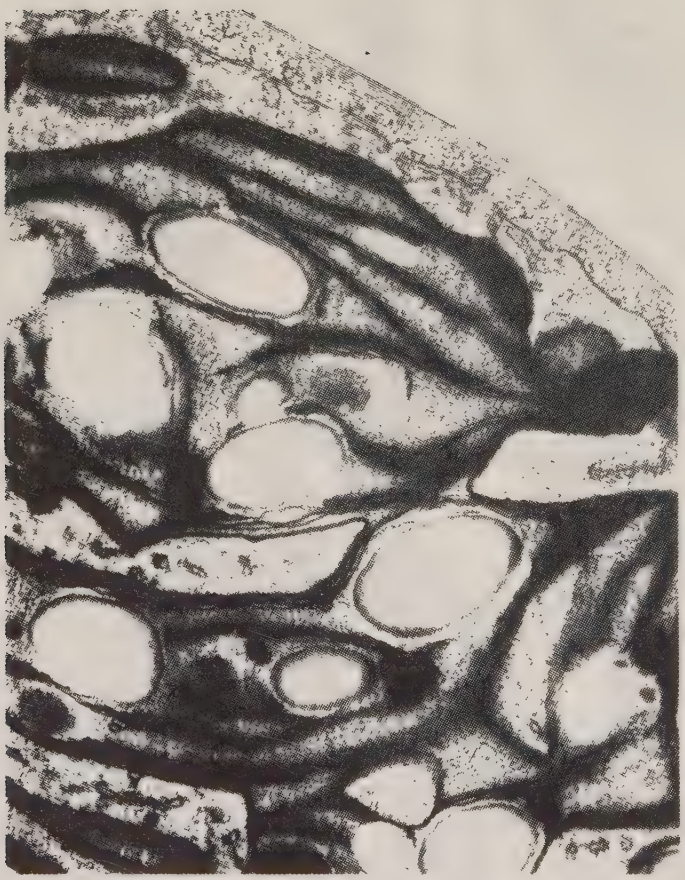


Abb.23. Ausschnitt aus der Zelle eines photoheterotroph gewachsenen Chlamydobotrys stellata, der sechs Stunden in Gegenwart von Cycloheximid in autotrophe Ernährungsbedingungen überführt wurde. Der Anteil an Doppelmembranen im Chloroplasten ist hier gegenüber der photoheterotrophen Kontrolle erhöht. 32000:1

Tab. 4. Anteil der in Doppelmembrankonfiguration (Granakonfiguration) verbundenen Thylakoide in v. H. der insgesamt vorhandenen Membranen im Chloroplasten von Chl. stellata sechs Stunden nach einem Wechsel der Kohlenstoffquelle unter der Einwirkung von Cycloheximid (20 µg/ml) und von Chloramphenicol (500 µg/ml).

C-Quelle während der Anzucht	anschließende Kulturbedingungen	% Doppelmembranen $\bar{x}$	min	max
Acetat (Kontrolle)	kein Wechsel	26,4	12,2	29,3
Acetat	CO_2 + Cycloheximid*)	49,7	38,9	60,8
Acetat	CO_2 + Chloramphenicol*)	58,2	34,9	73,6
CO_2 (Kontrolle)	kein Wechsel	74,4	63,1	84,8
CO_2	Acetat + Cycloheximid*)	54,4	37,7	75,9
CO_2	Acetat + Chloramphenicol*)	25,5	8,0	39,6

*) Kulturdauer nach einem Wechsel in der Ernährungsweise

Cycloheximid hemmt vollständig sowohl die physiologische Adaptation als auch das Wachstum (vgl. Kapitel 3.3.2.). Trotzdem erhöht sich in den ursprünglich mit Acetat kultivierten und auf CO_2-Ernährung umgestellten Algen bei Vergiftung mit Cycloheximid der Anteil der Doppelmembranen auf ca. 50 % (Abb. 23). Danach benötigt die Ausbildung von Doppelmembranen in ihrem letzten Schritt auch nicht die cytoplasmatische Proteinsynthese.

Diese Befunde beweisen, daß die Fähigkeit der Thylakoide zur Granabildung im Gegensatz zur physiologischen Adaptation nicht an eine Neusynthese von Proteinen gebunden ist.

Abb.24. Ausschnitt aus autotroph gewachsenen Chlamydobotrys stellata, die sechs Stunden in Gegenwart von Chloramphenicol an die Ernährung mit Acetat adaptiert wurden. Die meisten Thylakoidmembranen liegen einzeln. 45000:1

Abb. 25. Ausschnitt aus der Zelle eines autotroph angezogenen und sechs Stunden in Gegenwart von Cycloheximid an Photoheterotrophie adaptierten Chlamydobotrys stellata. Die meisten Thylakoidmembranen liegen einzeln. 60000:1

Adaptation von der Autotrophie an die Photoheterotrophie :
Wird in Kulturen von autotroph angezogenem Chl. stellata das CO_2 durch Acetat ersetzt, so weichen die zuvor in Grana angeordneten Membranen auseinander (vgl. 3.1.1.). Die Antibiotika Cycloheximid und Chloramphenicol können diesen Verlauf nicht unterbinden (Abb. 24 und 25), wie das Absinken des prozentualen Anteils an Doppelmembranen von ca. 75 % auf ca. 55 % bzw. 25 % zeigt. Auch diese Ergebnisse bedeuten, daß das Auseinanderweichen und die Fusion von Thylakoiden in ihrem letzten Schritt nicht über eine Proteinsynthese reguliert werden.

3.1.7. Die Chloroplastenstruktur bei gestörter Photosyntheseleistung

Die heutigen Vorstellungen über Regulationsmechanismen unterscheiden zwischen einer Regulation auf genetischer Basis, die über Proteinsynthesen verläuft, und einer Regulation, die ihre Wirkung über Aktivitätsänderungen von Enzymen entfaltet. Da für die Regulation der Struktur bei Chl. stellata die erste Möglichkeit - wie im vorigen Kapitel bewiesen - ausscheidet, sollte nun die zweite überprüft werden . Hinweise für eine Regulation im Zusammenhang mit der Funktion der Thylakoidmembranen bei der Photosynthese wurden bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen erbracht. Von Homann und Schmid (1967), sowie Wießner und Amelunxen (1969 a) wurde die Beziehung zwischen einer optimalen Photosyntheseleistung und der Partitionkonfiguration im Chloroplasten dadurch erklärt, daß die Doppelmembran die notwendige strukturelle Voraussetzung für ein funktionstüchtiges Photosystem II sei. Eine Übersicht über die für Chl. stellata bestehenden direkten Korrelationen zwischen Granakonfiguration und Photosyntheseleistung (Sauerstoffproduktion) bei unterschiedlichen Ernährungsbedingungen gibt die Tabelle 5 (vgl. auch Kapitel 3.3.1.).

Bei niedriger bzw. nicht vorhandener Sauerstoffentwicklung ist auch der Anteil an Doppelmembranen an der gesamten Membranmenge des Chloroplasten niedrig, während höhere und hohe Sauerstoffproduktion und ein größerer Anteil an Doppelmembranen miteinander korrelieren. Aus dieser Tatsache ergibt sich die

Frage, ob das "stacking" auch unmittelbar durch kurzfristige experimentelle Verhinderung der Photosyntheseaktivität beeinflußt werden kann und möglicherweise unmittelbar durch die Photosyntheseaktivität kontrolliert wird.

Tab. 5. Anteil der in Doppelmembrankonfiguration verbundenen Thylakoide in v. H. der insgesamt vorhandenen Membranen im Chloroplasten und die Sauerstoffproduktion von Chl. stellata sechs Stunden nach einem Wechsel in der Ernährungsweise.

C-Quelle während der Anzucht	anschließende Kulturbedingungen	% Doppelmembranen	O_2-Produktion*) in % der autotrophen Kontrolle
CO_2 (Kontrolle)	kein Wechsel	74	100
Acetat	+ CO_2	68	92
CO_2	+ CO_2 + Acetat	45	42
Acetat	- CO_2 - Acetat	33	8
Acetat	+ CO_2 + Acetat	28	2
CO_2	- CO_2 + Acetat	25	0
Acetat (Kontrolle)	kein Wechsel	26	0

*) auf Chlorophyllbasis berechnet und direkt in der Kulturlösung gemessen

Als experimentelle Eingriffe in den Photosyntheseablauf sowohl des autotroph als auch des photoheterotroph ernährten Chl. stellata wurden folgende Möglichkeiten gewählt :

a) Zugabe von DCMU

b) Verdunklung der Algen

c) Entzug von CO_2

Die Tabelle 6 faßt die Ergebnisse zu a) und b) zusammen. Zum Vergleich werden zusätzlich Kontrollergebnisse aus der Tabelle

1 aufgeführt. Die Befunde veranschaulichen , daß weder die Unterbindung des Elektronentransportes durch DCMU (Abb. 26), noch Verdunklung bei den mit Acetat oder den mit CO_2 kultivierten Algen das Verhältnis der ungepaarten zu den gepaarten Thylakoidmembranen beeinflussen .

Tab. 6. Anteil der in Doppelmembrankonfiguration verbundenen Thylakoide in v. H. an dem gesamten Membrananteil im Chloroplasten von Chl. stellata sechs Stunden nach Zugabe von DCMU (Endkonzentration 10^{-5} M) bzw. sechsstündiger Dunkelheit.

Kulturbedingungen	% Doppelmembranen		
	$\bar{X}$	min	max
Acetat (Kontrolle)	26,4	12,2	29,3
Acetat, verdunkelt	25,3	19,0	33,8
Acetat + DCMU	23,3	14,0	32,2
CO_2 (Kontrolle)	74,4	63,1	84,8
CO_2, verdunkelt	72,6	65,7	78,5
CO_2 + DCMU	75,9	69,4	65,4

Anders wirkt sich hingegen der Entzug des CO_2 auf die Chloroplastenstruktur aus (Tab.7). So bilden photoheterotroph angezogene Algen nach Entzug des Acetat nur dann zusätzliche "partitions" aus, wenn eine Begasung mit CO_2 erfolgt (Tab. 7, Spalte 1). Unterbleibt während des Adaptationsvorganges von der Photoheterotrophie an die Autotrophie die Versorgung mit CO_2, so steigt der Anteil der gepaarten Membranen im gesamten Thylakoidsystem nur geringfügig auf rund 30 % an (Tab. 7, Spalte 2; Abb. 28), während der Photosyntheseapparat der Organismen allerdings biochemisch völlig an die Autotrophie adaptiert (Kapitel 3.3.1.).

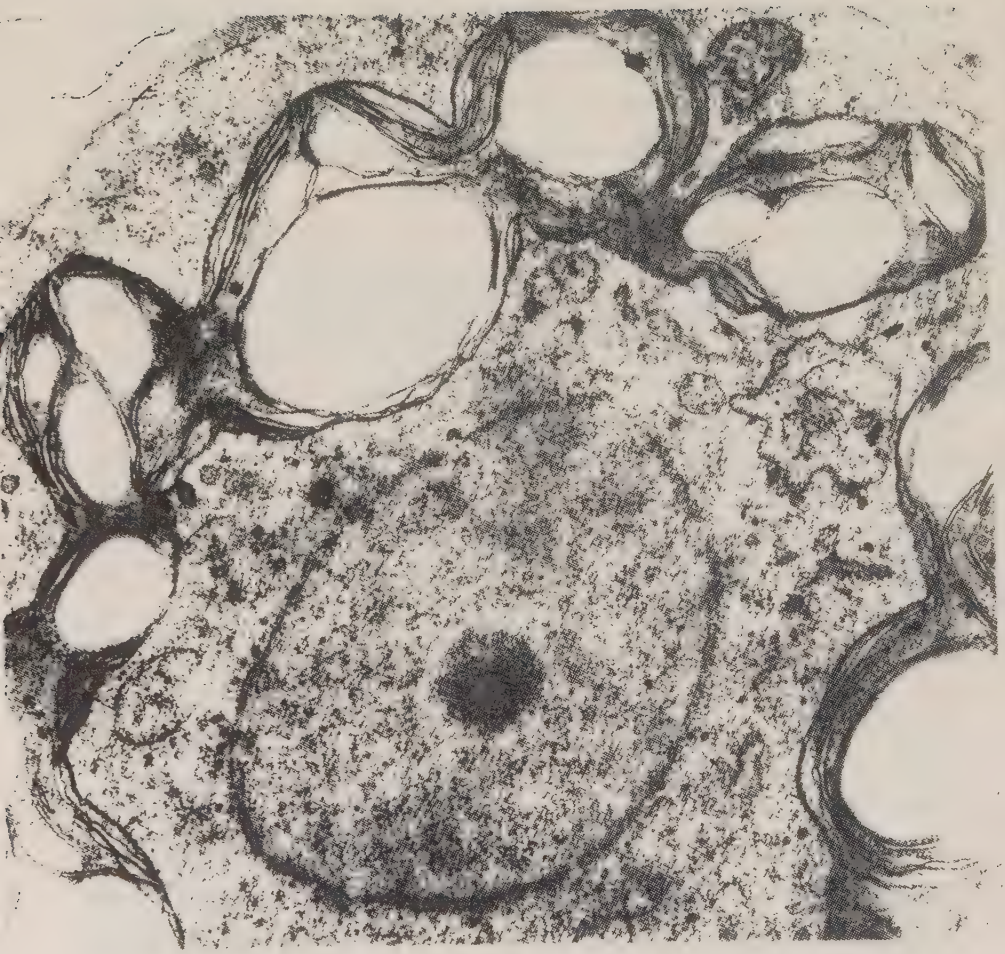


Abb.26. Ausschnitt aus der Zelle eines photoheterotroph angezogenen Chlamydobotrys stellata, der sechs Stunden unter der Einwirkung von DCMU stand. Das Thylakoidsystem wird durch DCMU nicht verändert, die Membranen bleiben in der ungepaarten Konformation. 24000:1

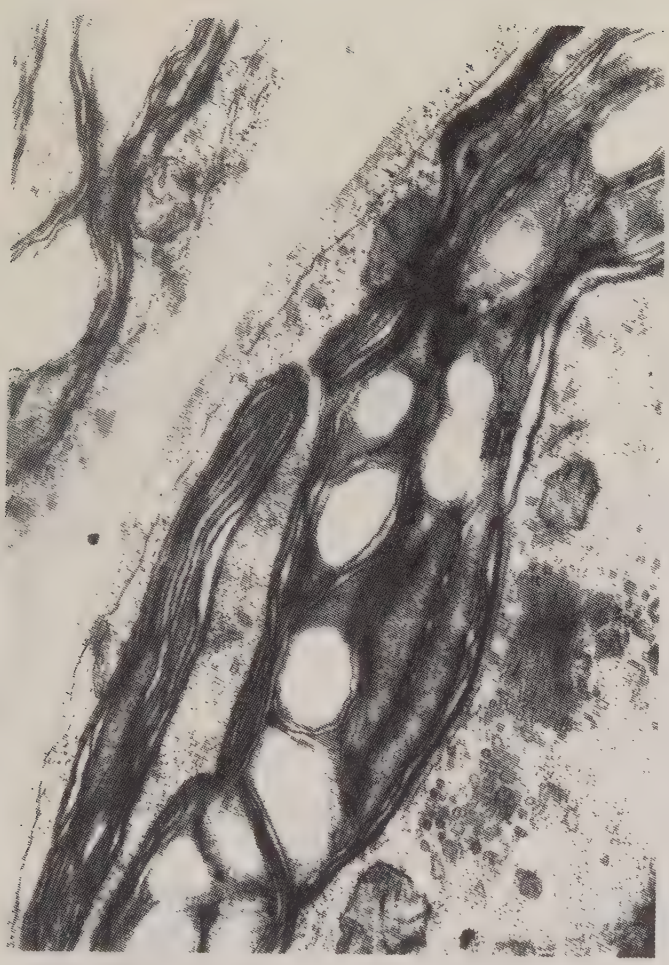


Abb.27. Ausschnitt aus der Zelle eines photoheterotroph angezogenen Chlamydobotrys stellata, der sechs Stunden ohne jede äußere Kohlenstoffquelle gehalten wurde. Die Thylakoide bleiben voneinander getrennt, obwohl die Organismen unter diesen physiologischen Bedingungen volle Photosynthesefähigkeit ausbilden. 29000:1

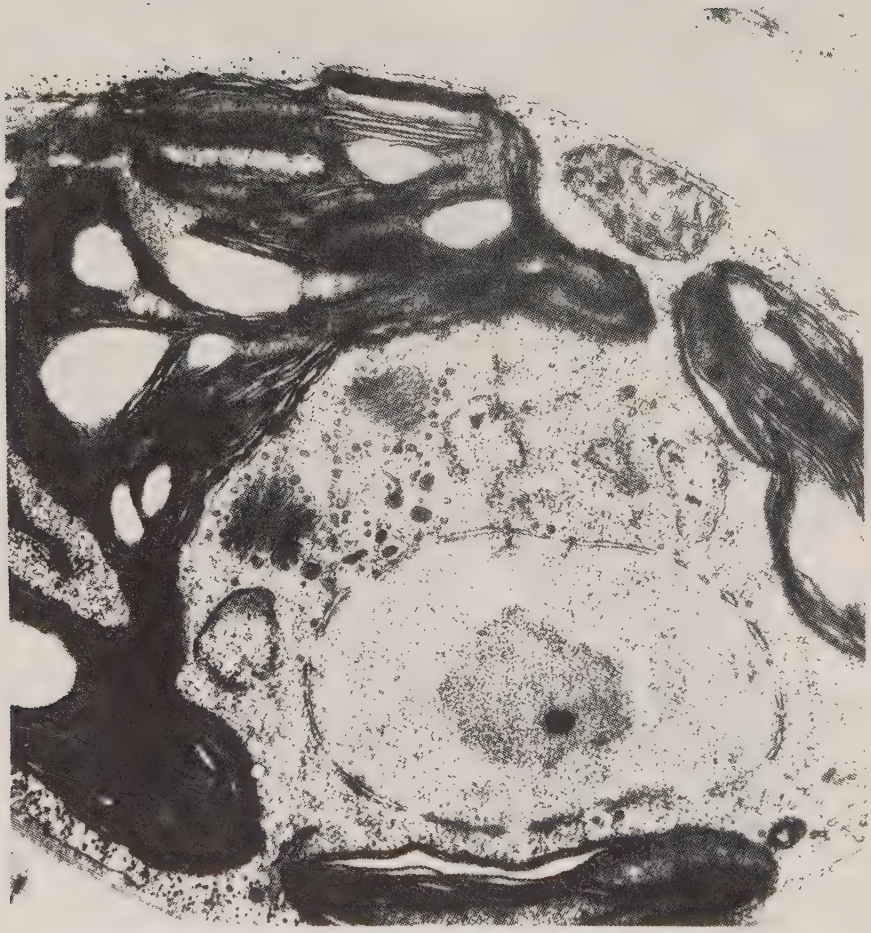


Abb.28. Ausschnitt aus der Zelle eines autotroph gewachsenen Chlamydobotrys stellata nach sechsstündigem CO_2-Entzug. In den Grana beginnen die Membranen sich zu trennen. 24000:1

Bemerkenswerterweise bewirkt der Entzug von CO_2 bei autotroph kultiviertem Chl. stellata bereits eine partielle Auflockerung des Membranarrangements (Abb. 2), sodaß sich schließlich nur noch durchschnittlich 45 % der Thylakoidmembranen in Membrankontakt befinden (Tab. 7, Spalte 4; Ausgangswert ist 75 %).

Tab. 7. Anteil der in Doppelmembrankonfiguration verbundenen Thylakoidmembranen in v. H. an dem gesamten Membrangehalt im Chloroplasten von Chl. stellata. Bei photoheterotroph kultivierten Algen nach einem Wechsel in der Ernährungsweise und bei Entzug der Kohlenstoffquelle. Bei autotroph angezogenen Algen nach Wechsel und Entzug der Kohlenstoffquelle und deren Beeinflussung durch 10^{-5} M DCMU.

Spalte	C-Quelle während der Anzucht	anschließende Kulturbedingungen (6 Stunden)	% Doppelmembranen $\bar{X}$	min	max
1	Acetat	- Acetat + CO_2 (=Kontrolle)	69,0	53,6	85,3
2	Acetat	- Acetat - CO_2	32,6	21,5	44,2
3	CO_2	+ Acetat - CO_2 (=Kontrolle)	24,6	4,2	41,9
4	CO_2	- Acetat - CO_2	44,8	25,2	76,7
5	CO_2	+ Acetat + CO_2	44,9	22,1	67,3
6	CO_2	- Acetat - CO_2 + DCMU	78,7	72,8	85,7
7	CO_2	+ Acetat - CO_2 + DCMU	72,6	60,2	79,5

Unter dem Einfluß von DCMU unterbleibt das normalerweise mit dem Entzug von CO_2 verbundene Auseinanderweichen der Thylakoide (Tab. 7, Spalten 6 und 7; Abb. 29 und 30).

Damit ist bewiesen, daß nicht nur eine normale CO_2-Versorgung für die Partitionkonfiguration in autotrophen Zellen von Chl. stellata verantwortlich ist, sondern daß diese in unmittelba-

Abb.29. Ausschnitt aus der Zelle eines autotrophen Chlamydobotrys stellata, der sechs Stunden ohne CO_2, aber mit DCMU gehalten wurde. Die Membranen sind hier überwiegend in der Partitionkonfiguration. 28000:1

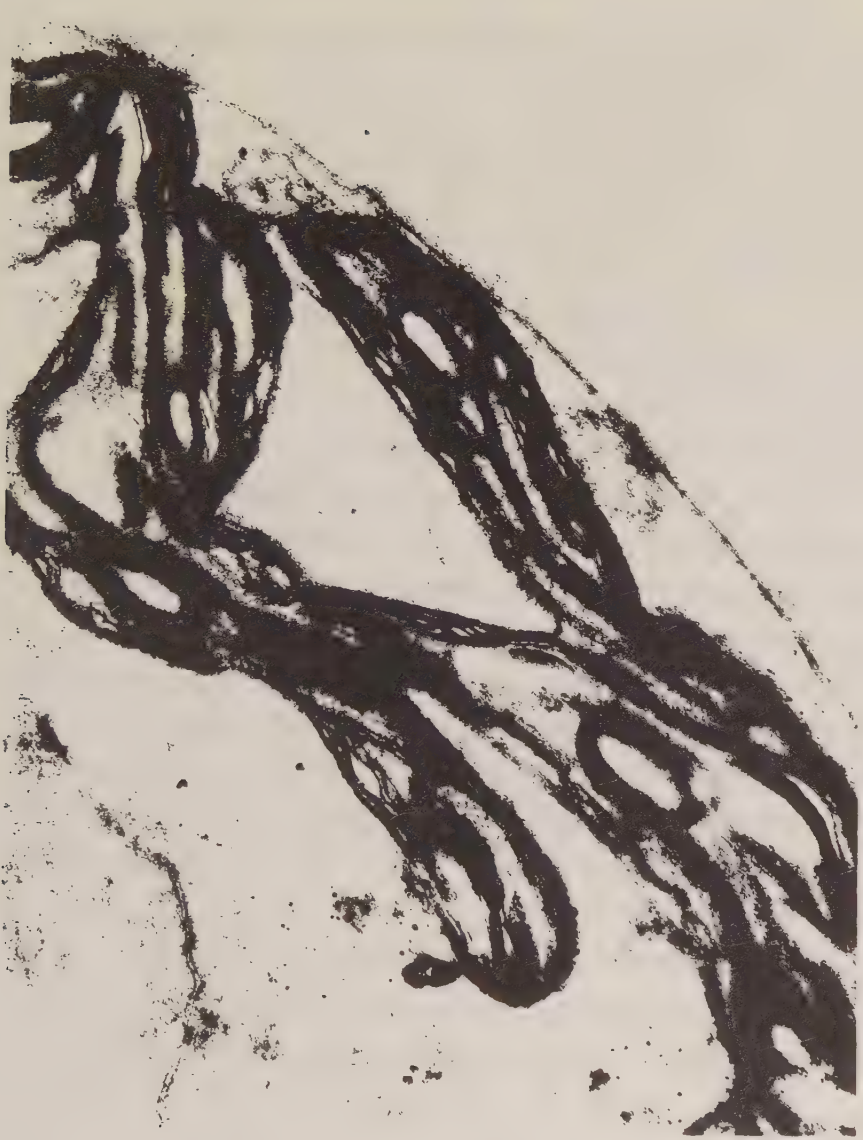


Abb.30. Zellausschnitt eines autotroph vorkultivierten und dann sechs Stunden an Photoheterotrophie in Gegenwart von DCMU adaptierten Chlamydobotrys stellata. Die Chloroplasten behalten unter dem Einfluß von DCMU die Granakonfiguration, verglichen mit den voneinander getrennten Thylakoiden in unvergifteten Zellen (vgl. Abb.6). 28000:1

rer Beziehung zum ungehinderten Ablauf des photosynthetischen Elektronentransportes steht.

(Aus dieser Tatsache könnte abgeleitet werden, daß die Anwesenheit von DCMU in photoheterotrophen Algen eine Partitionkonfiguration herbeiführen könnte. Dies ist jedoch nicht der Fall [Tab. 5] . Dies erklärt sich jedoch aus dem Fehlen der angenommenen Strukturkomponente bei photoheterotrophem Chl. stellata als Voraussetzung für das "stacking".)

In Übereinstimmung mit diesen Befunden führt auch die zusätzliche CO_2-Versorgung bei autotroph angezogenem und anschließend sechs Stunden mit Acetat kultiviertem Chl. stellata zu einem mit 45 % gegenüber dem Gehalt in photoheterotrophen Algen erhöhten Anteil an"partitions" im Thylakoidsystem (Tab. 7, Spalte 5). Der Kontrollwert der autotrophen Zellen von 75 % wird allerdings bei dieser gemischten Ernährungsweise ebenfalls nicht erreicht. Letzteres ist allerdings auch nicht zu erwarten, da in sechs Stunden - bei ausreichender Versorgung mit Energie und Kohlenstoffquellen - eine Vermehrung der Algen unter Substanzzunahme erfolgt. In den unter Acetateinfluß neugebildeten Thylakoiden sollte aber die strukturelle "stacking"-Komponente nicht vorhanden sein.

3.2. Diskussion

Als Hauptpunkte dieses Abschnittes meiner Arbeit möchte ich die folgenden fünf Befunde herausstellen und diskutieren :

1. Die Ursache des "stacking" in granahaltigen Chloroplasten ist eine Strukturkomponente, die eine Verbindung benachbarter Thylakoidmembranen über Mg^{2+}-Brücken ermöglicht.
2. Diese Strukturkomponente ist kein besonderer, elektronenmikroskopisch feststellbarer Bestandteil spezieller Thylakoidbezirke oder nur in den zu uneingeschränkter Photosyntheseleistung befähigten autotrophen Organismen vorhanden.
3. Die Strukturkomponente ist auch ein Bestandteil der photosynthetisch nicht optimal leistungsfähigen Chloroplastenmembranen des photoheterotroph kultivierten Chl. stellata, hier allerdings in inaktiver Form.
4. Die zum "stacking" notwendige Aktivierung der "stacking"-Komponente bzw. die Inaktivierung bei der physiologischen Adaptation von der Autotrophie an die Photoheterotrophie bzw. vice versa verläuft parallel zur jeweils veränderten Photosyntheseaktivität.
5. Wenn die "stacking"-Komponente in aktivierter Form vorliegt, kann zusätzlich eine Regulation der Chloroplastenstruktur unmittelbar über den photosynthetischen Elektronentransport erfolgen.

Die Existenz einer "stacking"-Komponente ergibt sich aus den Ergebnissen über den Einfluß von Magnesiumionen auf die Ausbildung von "partitions" zwischen Thylakoiden aus autotrophen und photoheterotrophen Zellen von Chl. stellata. Sie decken sich

mit den Befunden von Izawa und Good (1966), sowie Jacobi und Lehmann (1969), die in hypotonischem Medium isolierte Thylakoide bei Zusatz von Salzen wieder zum "stacking" bringen konnten. Daß sie auch in photoheterotroph ernährtem, nur noch zu verminderter CO_2-Fixierung fähigen Chl. stellata vorhanden ist, allerdings in einer inaktiven Form, konnte von mir durch den Befund, daß die bei diesem physiologischen Typ getrennten Thylakoide ohne vorherige Neusynthesen an Proteinen allein aufgrund eines veränderten Leistungsanspruches Doppelmembranen auszubilden vermögen, bewiesen werden.

Die Möglichkeit, daß die für die Verbindung benachbarter Thylakoide zuständige Strukturkomponente ein elektronenmikroskopisch sichtbarer Strukturbestandteil der Membran sein könnte, wurde bereits mehrfach von anderer Seite diskutiert. So beobachtete Staehelin (1967) auf den Thylakoidflächen von Chlorella Fibrillen, deren Durchmesser bei 40 Å liegen soll, und die die Membranen verbinden. Nach einem Modell von Pendland und Aldrich (1973) sollen nach Gefrierätzung auf den Membranbruchflächen von Oocystis sichtbare 170 Å große Partikeln aneinandergrenzenden Membranen gleichzeitig angehören und auf diese Weise benachbarte Thylakoide miteinander verbinden. Beide Modellvorschläge treffen für Chl. stellata nicht zu. Einmal konnten den 40 Å-Fibrillen ähnliche Oberflächenstrukturen nicht nachgewiesen werden. Zum anderen ragen die 160 Å-Partikeln der Thylakoidmembranen von Chl. stellata nur zu etwa 2/3 ihrer Breite (kalkuliert aus Schattenlänge und Bedampfungswinkel) aus der Membranbruchfläche hervor und können

daher nicht mit den Partikeln von Pendland und Aldrich identisch sein. Die von mir ermittelten Maße stimmen mit Angaben von Mühlethaler et al. (1965) und den Wiedergaben in den Modellen von Branton und Park (1967), Park und Pfeifhofer (1969) und Arntzen et al. (1969) überein.

Abweichend von den eben diskutierten Befunden wurde ferner von verschiedenen Autoren (Remy 1969, Phung Nhu Hung 1970, Goodenough und Staehelin 1971) nicht die Existenz bestimmter Partikeln, sondern die Dichteverteilung der 160-180 Å-Partikeln, die bei dem Gefrierbruch zutage treten, mit dem "stacking" parallel gesetzt. Diese Arbeitsgruppen stellten im Granabereich eine viel dichtere Verteilung an 160-180 Å-Partikeln als im Intergranabereich fest. Goodenough und Staehelin (1971) halten außerdem für wahrscheinlich, daß diese Partikeln nicht selbst für den Membrankontakt verantwortlich sind, sondern eine Folge des auf unbekannte Ursachen zurückgehenden "stacking" sind. Die in dieser Arbeit vorlgelegten Ergebnisse zeigen jedoch, daß bei Chl. stellata Größe und Verteilung der 160 Å großen Partikeln in den Thylakoidmembranen aus dem Grana- und dem Intergranabereich und ebenso aus den Chloroplasten des autotroph und des photoheterotroph angezogenen Chl. stellata identisch sind. Es muß hieraus gefolgert werden, daß die Anwesenheit und die Verteilung der 160 Å-Partikeln für das "stacking" nicht ausschlaggebend sind.

In diesem Zusammenhang ist die Frage zu diskutieren, ob die 160-180 Å-Partikeln, wie von Arntzen und Mitarbeitern (1969)

wegen ihres gehäuften Auftretens in Photosystem-II-angereicherten Fraktionen angenommen, als Indikator für das Photosystem II ("photosystem-II-marker") anzusehen sind. Das gehäufte Vorkommen dieser Partikeln gerade in der Granaregion verschiedener höherer Pflanzen und Grünalgen (Remy 1969, Phung Nhu Hung et. al. 1970, Sane et al. 1970, Goodchild und Park 1971, Goodenough und Staehelin 1971, Pendland und Aldrich 1973) hat einige dieser Autoren zu derselben Annahme veranlaßt, da das Photosystem II dem Granabereich zugeschrieben wird. Außerdem besitzt eine Photosystem-II-defekte Euglena-Mutante (Schwelitz et. al. 1972) nur 110 Å- und keine 160-180 Å-Partikeln. Ferner soll bei ergrünenden Organismen (Euglena, Hordeum) die Entwicklung der Photosyntheseaktivität parallel zum Auftreten der größeren Partikeln verlaufen (Phung Nhu Hung et al. 1970, Ophir und Ben-Shaul 1973). Interessant wäre in diesem Zusammenhang, wenn auch die Bündelscheidenchloroplasten von C_4-Pflanzen, denen das Photosystem II fehlen soll (Woo et al. 1970, Downton und Pyliotis 1970) mittels Gefrierätzung untersucht werden würden und ihnen ebenfalls die 160-180 Å-Partikeln fehlten. Auch für Chl. stellata ist eine Zuordnung dieser Partikeln zum Photosystem II nicht ohne weiteres auszuschließen. Zwar zeigt der photoheterotroph mit Acetat gezogene Chl. stellata weder Hillreaktionsaktivität (Merrett 1969) noch eine CO_2-Fixierung (Wießner 1969) und Sauerstoffentwicklung (Kapitel 3.3.1.) , doch sind im Chloroplasten viele der dem Photosystem II zugeschriebenen Komponenten, wie Pigmente und Chinone vorhanden, und es spricht auch der Membrangehalt an Lipoiden nicht für das Fehlen des Photosystems II (Wießner 1962, Wießner und French 1970, Thiede und Wießner 1974). Mende und Wießner (1974)

diskutieren daher, daß das Photosystem II auch in photoheterotrophem Chl. stellata vorhanden ist und nur seine Aktivität blockiert ist.

Ein auffälliger Unterschied zwischen Chl. stellata und anderen Organismen ist das bereits bei der Besprechung der Ergebnisse erwähnte Verhältnis der Menge an 110 Å-Partikeln zu der an 160 Å-Partikeln. Es beträgt bei photoautotrophem Chl. stellata 4 : 1, bei anderen Organismen in den Grana ca. 1,5 - 2,5 : 1. Es scheint mit jedoch verfrüht zu sein, diesen Unterschied als Ursache für die verringerte Aktivität des Photosyntheseapparates auch des autotrophen Chl. stellata zu bewerten.

Die elektronenmikroskopischen Befunde, daß bei Chl. stellata partikuläre Elemente auf oder in den Thylakoidmembranen - die in der Literatur teils als Proteine, teils als Lipoproteinkomplexe identifiziert bzw. diskutiert werden (Howell und Moudrianakis 1967, Kreutz 1969, Moor 1969, Sitte 1969, Meyer und Winkelmann 1969, Bullivant 1970, Tillack und Marchesi 1970)- ursächlich für den Membrankontakt nicht verantwortlich sind, stimmen gut mit den Ergebnissen überein, daß a) die prozentuale Zusammensetzung der Lipoide in den granahaltigen Chloroplasten autotropher und in den granalosen Chloroplasten photoheterotropher Chl. stellata identisch ist (Thiede und Wießner 1974) und daß b) die "partitions" unabhängig vom Ablauf von Proteinsynthesen gebildet werden. Denn in den Membranen der Chloroplasten photoheterotroph angezogener und auf autotrophe Ernährungsweise umgestellter Chl. stellata wird die strukturelle "stacking"-Komponente wirksam, ohne daß eine cytoplasmatische

und plastidäre Neusynthese von Proteinen erfolgen muß. Ebenso verhindert die Unterbindung jeder Proteinsynthese nicht das Auseinanderweichen der Thylakoide bei der Umstellung von der autotrophen zur photoheterotrophen Ernährung.

Nachdem die vorgelegten Ergebnisse keinen Zusammenhang zwischen der Granamenge und dem Vorhandensein spezieller Strukturkomponenten oder dem Ablauf spezieller Proteinbiosynthesevorgänge aufzeigen konnten, sollen nun alle diejenigen Ergebnisse diskutiert werden, die auf die Photosyntheseaktivität als Regulativ der Chloroplastenstruktur hindeuten. Als erster Hinweis ist anzuführen, daß die experimentelle Regulation des mengenmäßigen Anteils an Doppelmembranen im Thylakoidsystem in vivo ursächlich von der Versorgung mit CO_2 abhängt. Wie gezeigt wurde, weichen Thylakoidbezirke, die vorher in Grana vereinigt waren, bei CO_2-Entzug auseinander und eine fehlende CO_2-Versorgung verhindert bei der Adaptation photoheterotropher Chl. stellata an die Autotrophie die Ausbildung von "partitions". Ferner können die Thylakoide bei einem Wechsel in der Kohlenstoffversorgung schon innerhalb kurzer (1 - 2 Std.) Zeit auseinanderweichen, während andere, von einer Proteinsynthese abhängige Regulationsvorgänge bis zu ihrem Abschluß vier bis sechs Stunden benötigen (Wießner und Amelunxen 1969 b, Wießner und French 1970, Kapitel 3.3.1.). Ausschlaggebend für das Auseinanderweichen der Thylakoide bei Entzug von CO_2 und/oder Acetatversorgung ist der ungestörte Ablauf des photosynthetischen Elektronentransportes, denn der Hemmstoff DCMU unterbindet jegliche Transformation der Chloroplastenstruktur.

Dies deutet auf eine direkte Beziehung zwischen dem "stacking" und dem photosynthetischen Elektronentransport hin. (In der älteren Literatur finden sich allerdings auch Hinweise über eine direkte Ionenwirkung des Carbonat auf Chloroplasten [Good 1963, Heise und Gaffron 1963]). Aufgrund dieser Befunde scheint mir die Hypothese (vgl. auch Thiede und Wießner 1974) berechtigt, daß in autotrophen und in photoheterotrophen Chl. stellata verschiedene Ladungsverhältnisse auf den Thylakoidmembranen vorliegen, die als Erklärung für die beobachteten Strukturunterschiede anwendbar ist. Die Ursache einer solchen Ladungsänderung auf den Thylakoidmembranen in den ursprünglich autotroph kultivierten Chl. stellata beim Übergang zur Photoheterotrophie ist das Fehlen des CO_2 als terminalem Elektronenakzeptor der Photosynthese. Dadurch ist ein optimaler Durchfluß von Elektronen durch die Redoxkette des photosynthtischen Elektronentransportes nicht mehr möglich. Im Licht muß dies bei unverminderter Aktivität des Photosystem II zu einem vorwiegend reduzierten Zustand der einzelnen Komponenten der photosynthetischen Elektronentransportkette vom Photosystem II zum Photosystem I führen. Dieser Redoxzustand könnte seinerseits Rückwirkungen auf die Konformation von Membranproteiden haben, sodaß im Normalzustand mögliche Bindungen zwischen benachbarten Thylakoiden bei überwiegend reduziertem Zustand der Elektronentransportkette nicht mehr geknüpft werden können. Für diese Theorie sprechen die von mir vorgelegten Ergebnisse über den Einfluß von DCMU auf die Änderungen der Chloroplastenstruktur. Im Falle der Anwesenheit von DCMU ist eine "Überreduktion" der Redoxkomponenten zwischen Photosystem II

und Photosystem I nicht möglich. Mit dieser Hypothese über die Regulation der Chloroplastenstruktur in vivo stimmen die Ergebnisse von Berg, Dodge, Krogmann und Dilley (1974) überein. Diese Autoren kamen aufgrund einer in vitro - Untersuchung an Chloroplasten aus Spinat zu dem Schluß, daß das "stacking" zumindest zu einem Teil durch negativ geladene Gruppen in der Thylakoidmembran kontrolliert wird.

Der soeben vorgestellte Mechanismus zur Regulation der Chloroplastenstruktur ist an des Vorhandensein einer aktiven "stacking"-Komponente gebunden und kann aufgrund der vorgelegten Befunde nur beim Übergang von der Autotrophie zur Photoheterotrophie stattfinden. Denn die getrennten Thylakoide des photoheterotrophen Chl. stellata können durch kurzfristige experimentelle Eingriffe weder in vivo noch in vitro zu einer Bildung von Doppelmembranen veranlaßt werden. Dabei muß auch in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten des photoheterotroph ernährten Chl. stellata die "stacking"-Komponente bereits ein Membranbestandteil sein, allerdings in inaktiver Form . Nur so läßt sich erklären, daß die "stacking"-Komponente bei der Umstellung der Algen auf die Autotrophie auch ohne Neusynthesen von Proteinen wirksam wird. Die Inaktivierung der "stacking"-Komponente muß mit der Versorgung der Alge mit Acetat als Kohlenstoffquelle in direkter Beziehung stehen. Denn Acetat bewirkt (vgl. Kapitel 3.2.1.) eine Blockierung der Photosyntheseaktivität, die im Übrigen ebenfalls von Proteinsynthesen unabhängig ist und die auch bei reichlicher CO_2-Versorgung bestehen bleibt. Hierfür eine Erklärung anzubieten,

erscheint mir jedoch verfrüht zu sein.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Theorie ist geeignet, auch die teils widersprüchlichen Ergebnisse zu erklären, die für Mutanten von Nicotiana, Euglena, Chlamydomonas gewonnen wurden. Dort wurde einerseits eine Parallelität zwischen einem defekten Photosystem II und dem Fehlen von Grana beobachtet (Homann und Schmid 1967, Schwelitz et al. 1972), andererseits konnte jedoch in granalosen Chloroplasten einer Mutante von Chlamydomonas (Goodenough et al. 1969) eine Photosystem-II-Aktivität nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, daß im zuletzt erwähnten Fall für die Granakonformation notwendige Strukturelemente ohne die Beeinträchtigung der Photosystem-II-Aktivität durch die Mutation verändert worden sind.

3.3. Die Regulation der physiologischen Leistung von Chlamydobotrys stellata in Abhängigkeit von der Kohlenstoffversorgung

Die in den vorangegangenen Abschnitten dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zum Problem der Regulation der Chloroplastenstruktur von Chlamydobotrys stellata in vivo haben gezeigt, daß die Auflösung der Partitionkonfiguration sowie die Fusion getrennter Thylakoidmembranen unmittelbar auf Veränderungen in der Photosyntheseaktivität und den damit verbundenen Ladungsänderungen an der Thylakoidmembran zurückzuführen sind und daß sie keiner Proteinsynthesen bedürfen. Damit ergibt sich als Problem, auf welche Weise die Aktivität des Photosyntheseapparates in Chl. stellata selbst reguliert, d. h. durch welche Regulationsmechansismen sie kontrolliert wird. Zur Lösung dieser Aufgabe sollte die Beantwortung der folgenden drei Fragen beitragen :

1) Besitzt der photoheterotrophe Chl. stellata möglicherweise bereits einen voll funktionsfähigen Photosyntheseapparat, dessen Leistung, ebenso wie die Ausbildung von Granastrukturen , lediglich aktiviert werden muß?

2) Welches der beiden Kohlenstoffsubstrate, das CO_2 oder das Acetat oder möglicherweise beide, reguliert bzw. regulieren als Effektor(en) die Veränderungen in der toffwechselphysiologischen und der photosynthetischen Leistung des Organismus?

3) Ist für die Ausbildung der Photosynthesekapazität im Gegensatz zur Bildung von Granastrukturen die Neusynthese von Pro-

tein und möglicherweise ihr Einbau in die Thylakoidmembran notwendig?

Die zu diesen Fragen erbrachten Befunde werden in den nachfolgenden Kapiteln vorgestellt.

3.3.1. Die physiologische Adaptation bei einem Wechsel in der Ernährungsweise

Die physiologische Adaptation des photoheterotroph vorkultivierten Chl. stellata an die Autotrophie vollzieht sich innerhalb von sechs Stunden. Als Beweise sind die folgenden Befunde anzuführen :

1) Die Verschiebung der Chlorophyllabsorption in vivo in den kürzerwelligen Spektralbereich (Abb. 31). Bei Beendigung des Adaptationsvorganges gleicht das Absorptionsspektrum des an die Autotrophie adaptierten Chl. stellata dem der ständig autotroph kultivierten Algen.

2) Die Senkung des Chlorophyll a : b -Verhältnisses von 9 - 10 : 1 auf 5 : 1 (Tab. 8, Zeilen 3 und 5). Diese Zunahme an Chlorophyll b gibt sich durch das Auftreten des Chlorophyll-b-Gipfels im Differenzspektrum bei 650 nm zu erkennen (Abb. 31 a).

3) Nach sechsstündiger Adaptation haben die Algen die volle Photosyntheseaktivität erreicht (Abb. 32). Diese Ergebnisse stimmen mit den Angaben von Wießner und Amelunxen (1969 b) über das Verhalten der photosynthetischen CO_2-Fixierung während des Adaptationsvorganges überein.

Die physiologische Adaptation des autotroph angezogenen Chl. stellata an die Photoheterotrophie benötigt ebenfalls mehrere Stunden . Dies zeigt

1) die Veränderung des Absorptionsspektrums, die innerhalb von sechs Stunden angeschlossen ist (Abb. 31 b),

2) der Abfall im Chlorophyll-b-Gehalt (Tab. 8, Zeile 7),

3) das adaptive Verhalten der Fähigkeit zur Acetatassimilation (Abb. 33),

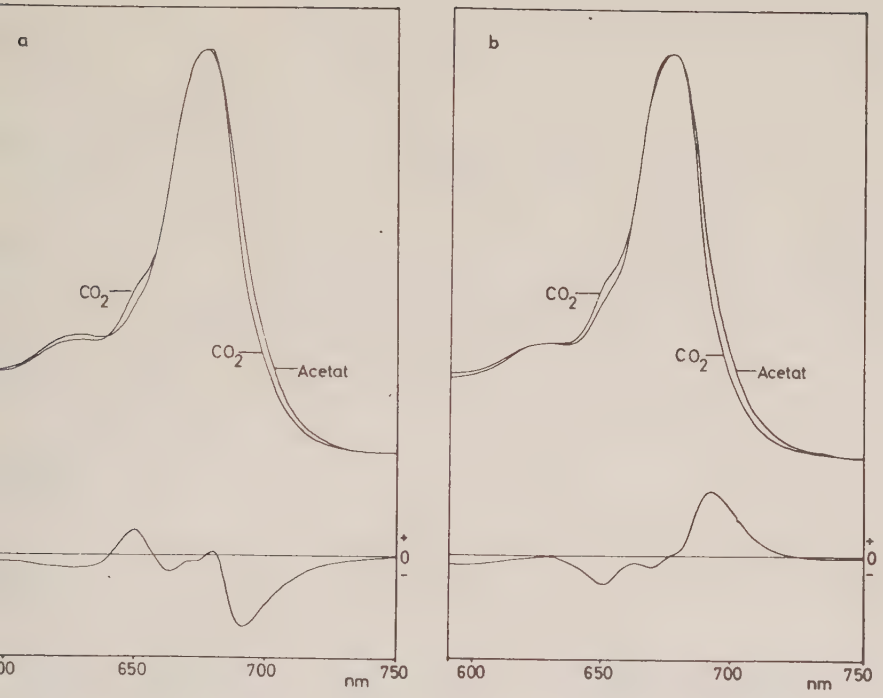


Abb. 31. Absorptionsspektren (Meßbereich 0-1 OD) und Differenzspektren (Meßbereich 0-0,5 OD) der Chloroplastenpartikeln von a) photoheterotroph gewachsenen (Acetat) und anschließend an autotrophe Bedingungen adaptierten Algen (CO_2), b) von autotrophen Wachstumsbedingungen (CO_2) an Photoheterotrophie (Acetat) adaptierten Chl. stellata.

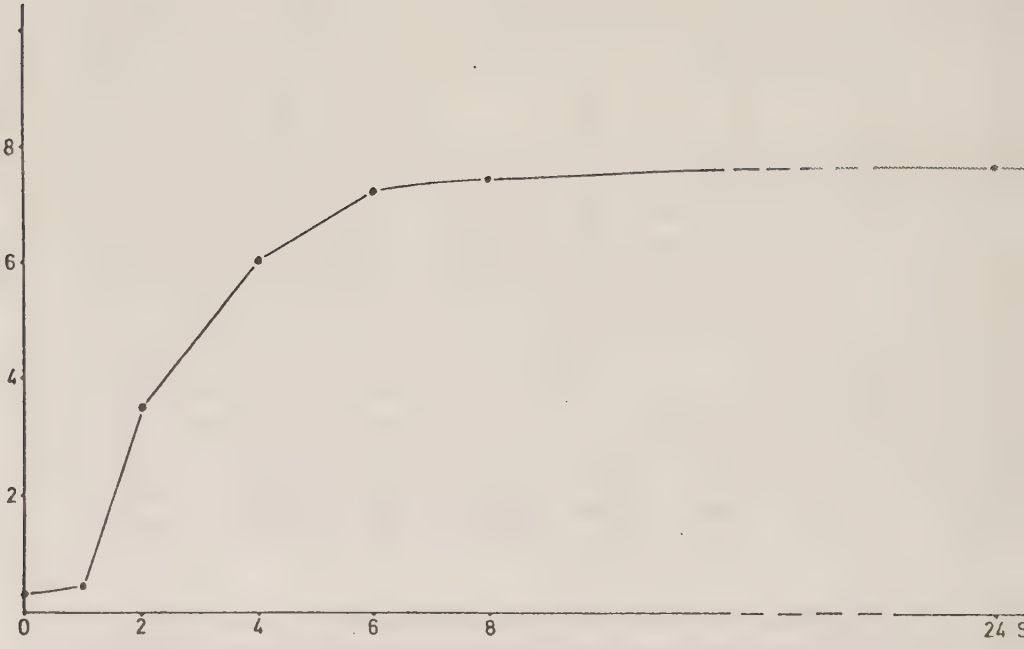


Abb.32. Sauerstoffproduktion von Chlamydobotrys stellata beim Übergang von der photoheterotrophen zur autotrophen Ernährungsweise.
Abszisse: Zeit nach Beginn der CO_2- Begasung.

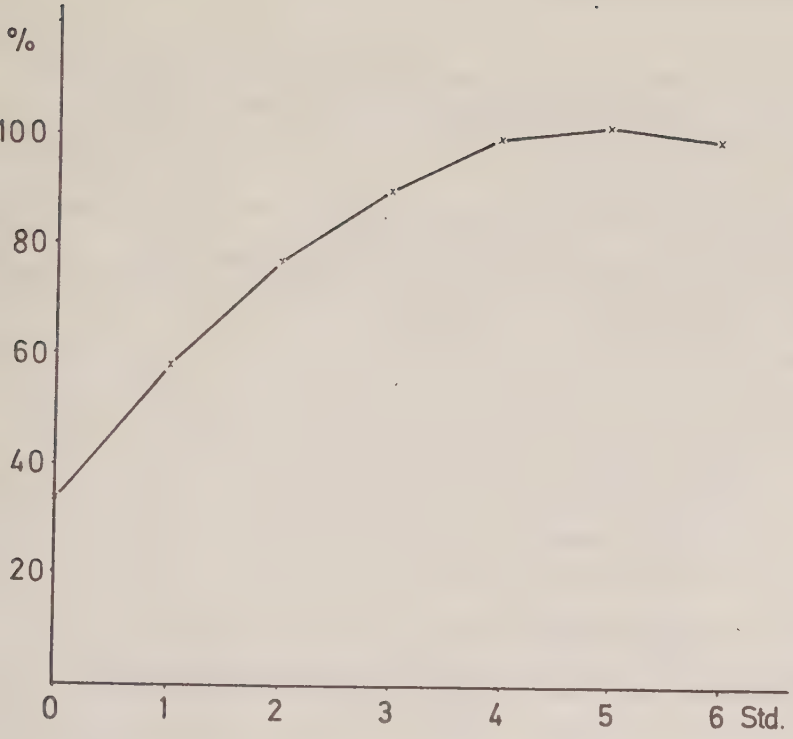


Abb. 33. Einbau von Methyl-markiertem Acetat in Kulturen von Chlamydobotrys stellata nach Wechsel von der autotrophen zur photoheterotrophen Ernährungsweise. Einbau vier Stunden nach Wechsel der Kohlenstoffquelle = 100 %.

4)die deutlich verringerte Photosyntheseleistung (gemessen als Sauerstoffproduktion) nach Beendigung des Adaptationsvorganges. Sie erreicht nach sechs Stunden nur noch knapp die Hälfte ihres Ausgangswertes und ist nach 24 Stunden bis auf ca. 7 % gesunken (Abb. 34).

Tab. 8. Veränderung der Chlorophyllabsorption[x)] und des Chlorophyll a : b -Verhältnisses, sowie das Wachstum[xx)] von Chl. stellata bei einem Wechsel in der Art der Kohlenstoffversorgung.

Zeile	C-Quelle während der Anzucht	anschließende Kulturbedingungen (6 Stunden)	Verhältnis Chl. a / Chl. b	Veränderungen der Absorptionsspektren	Zunahme an : Chl.	TG	Prot.
1	Acetat	kein Wechsel	9,9 : 1	-	+	+	+
2	Acetat	+ CO_2 + Acetat	9,3 : 1	-	+	+	+
3	Acetat	+ CO_2 - Acetat	5,1 : 1	+	+	+	+
4	Acetat	- CO_2 - Acetat	5,9 : 1	+	-	-	-
5	CO_2	kein Wechsel	4,8 : 1	-	+	+	+
6	CO_2	+ CO_2 + Acetat	8,4 : 1	+	+	+	+
7	CO_2	- CO_2 + Acetat	7,8 : 1	+	+	+	+
8	CO_2	- CO_2 - Acetat	4,8 : 1	-	-	-	-

x) gemessen an Chloroplastenpartikeln in Phosphatpuffer

xx) gemessen als Chlorophyll-, Protein- und Trockengewichtszunahme während des sechsstündigen Adaptationsvorganges.

Eine Adaptation von der Photoheterotrophie an die Autotrophie tritt auch dann ein, wenn photoheterotroph angezogenem Chl. stellata nur das Acetat entzogen, nicht aber als neue Kohlenstoffquelle gleichzeitig CO_2 angeboten wird. Als Indiz seien wiederum angeführt : a) die Verschiebung der maximalen Absorption der Chlorophyll-a-Komponenten in den kurzwelligeren Bereich, b) die Erhöhung des Chlorophyll-b-Gehaltes (Tab. 8,

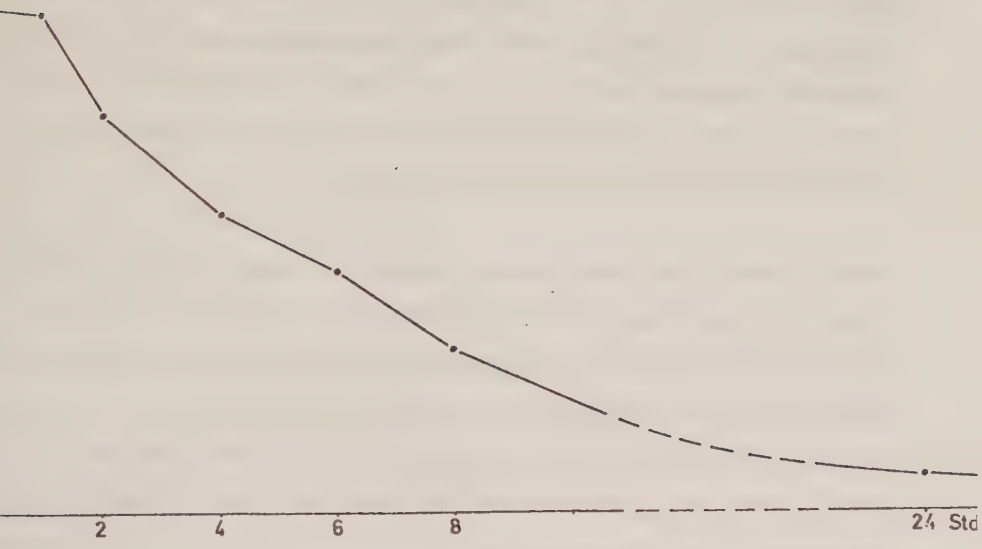


Abb.34. Sauerstoffproduktion von Chlamydobotrys stellata beim Übergang von autotropher zu photoheterotropher Ernährung.(Messung in acetatfreier, CO_2-angereicherter Nährlösung.)
Abszisse: Zeit nach dem Wechsel in der Kohlenstoffversorgung.

Zeile 3),und d) der Anstieg in der Sauerstoffproduktion (Abb. 36). Dieser Adaptationsvorgang geschieht, obwohl die Organismen infolge Kohlenstoffmangel nicht wachsen (keine Zunahme an Chlorophyll, Trockengewicht und Protein; Tab. 8, Zeile 4). Damit ist bewiesen, daß die physiologischen Änderungen von der Photoheterotrophie an die Autotrophie tatsächlich von den zum Zeitpunkt der Umstellung vorhandenen Zellen vollzogen wird und das veränderte physiologische Verhalten nicht etwa nur den neugebildeten Tocheterzellen eigen ist. Ferner ergibt sich aus den angeführten Befunden, daß für die Adaptation des photoheterotrophen Chl. stellata an die Autotrophie ein exogenes CO_2-Angebot nicht notwendig ist. Bei dieser Alge leitet bereits das Fehlen von Acetat in der Nährlösung den physiologischen Adaptationsvorgang an die CO_2-Assimilation ein.

Anders liegen die Verhältnisse hingegen, wenn autotroph angezogenem Chl. stellata jede Kohlenstoffquelle entzogen wird. In diesem Falle verändert sich weder das Chlorophyll-a-Absorptionsspektrum in vivo noch das Chlorophyll a : b -Verhältnis (Tab. 8, Zeile 8). Der Entzug der Kohlenstoffquelle während der Kultur erzielt somit bei autotrophen Chl. stellata nicht dieselbe Wirkung wie bei photoheterotrophen.

Damit ist bewiesen, daß die An- oder Abwesenheit von Acetat, nicht aber die An- oder Abwesenheit von CO_2 das stoffwechselphysiologische Verhalten von Chl. stellata reguliert und es muß entweder Acetat selbst oder ein Produkt seines Stoffwechsels als stoffwechsesregulierender Effektor wirken. Diese

Schlußfolgerung wird zusätzlich noch durch die folgenden Ergebnisse gestützt : Bei gleichzeitigem Angebot von Acetat und CO_2 behält photoheterotroph vorkultivierter Chl. stellata stets alle Charakteristika der normal photoheterotroph ernährten Alge (Tab. 8, Zeile 2; Abb. 36). Die zusätzliche Begasung mit CO_2 vermag bei Anwesenheit von Acetat keine Umstellung in Richtung Autotrophie zu bewirken. Wird hingegen autotroph vorkultivierten Organismen neben CO_2 zusätzlich Acetat gegeben, so erniedrigt sich trotz fortwährender CO_2-Begasung als Folge der Aceatzugabe die Sauerstoffproduktion (Abb. 37), verändert sich das Absorptionsspektrum und sinkt der Chlorophyll-b-Gehalt (Tab. 8, Zeile 6). Ausdrücklich sei erwähnt, daß die Abnahme der Photosyntheseleistung eine tatsächliche und nicht eine durch Veränderung der Bezugsgröße nur scheinbare Leistungsänderung ist, oder ausschließlich auf den Zellzuwachs in der Kultur zurückgeht. Zwar erhöht sich der Chlorophyllgehalt während der Adaptationsphase an die Photoheterotrophie stetig : So erfolgt im Anschluß an den Wechsel in der Art der Kohlenstoffquelle noch eine Stunde lang eine der Kontrolle entsprechende Chlorophyllzunahme (Abb. 35). Anschließend stagniert diese jedoch ungefähr zwei Stunden lang und erst nach dieser Stagnationsphase setzt sie wieder ein. Sie hat nach insgesamt sechs Stunden den Kontrollwert bereits überholt. Innerhalb des sechsstündigen Adaptationsvorganges hat der Chlorophyllgehalt in der Kultur damit um etwa 50 % zugenommen. Der Zuwachs an Trockengewicht und Protein entspricht diesen Werten. Da ständig photoheterotroph ernährter Chl. stellata keine Photosyntheseaktivität besitzt, sollte diese auch den während des sechsstündigen

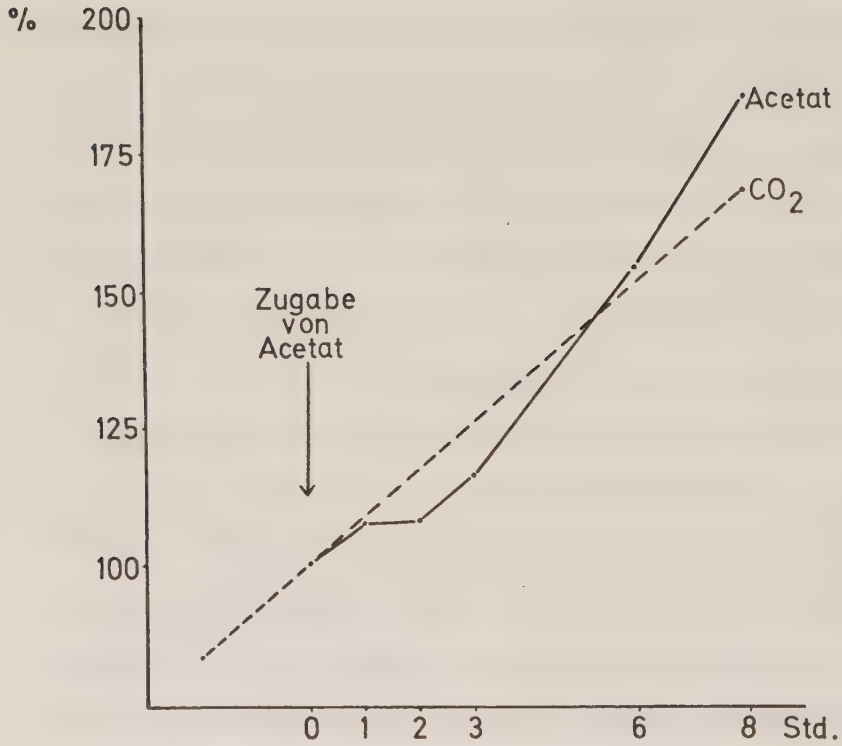


Abb. 35. Relative Zunahme des Chlorophyllgehaltes in einer autotroph ernährten Kultur von Chlamydobotrys stellata (----), sowie beim Übergang von der autotrophen zu photoheterotrophen Ernährung (——). Chlorophyllgehalt zur Stunde 0 (= Wechsel in der Ernährungsweise) = 100 %.

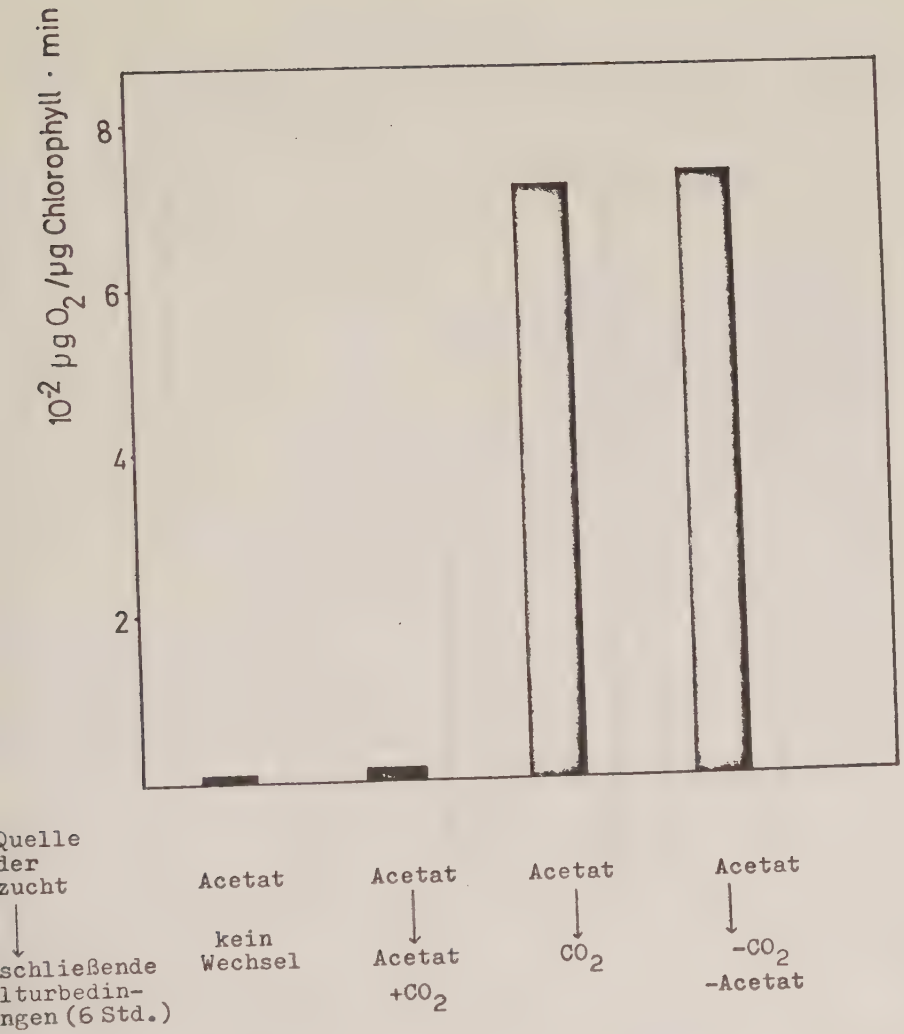
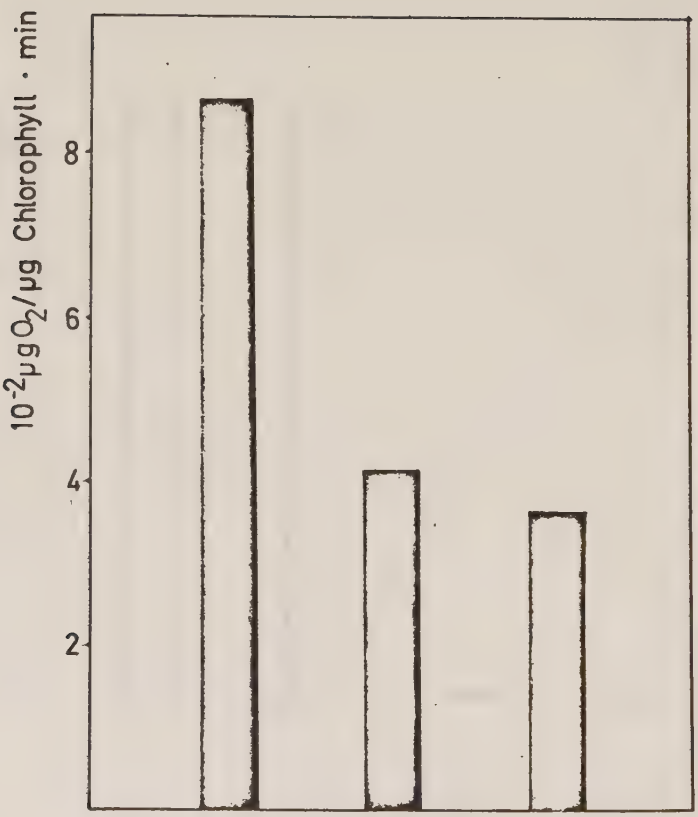


Abb. 36. Sauerstoffproduktion durch photoheterotroph vorkul- tivierten und anschließend sechs Stunden lang mit einer ande ren, mit zwei, sowie ohne jede Kohlenstoffquelle gehaltenen Chlamydobotrys stellata.



C-Quelle der Anzucht	CO_2	CO_2	CO_2
↓		↓	↓
anschließende Kulturbedingungen (6 Std.)	kein Wechsel	Acetat	Acetat $+CO_2$

Abb. 37. Sauerstoffproduktion durch autotroph vorkultivierten und anschließend sechs Stunden mit einer anderen bzw. zwei Kohlenstoffquellen gehaltenen Chlamydobotrys stellata.

Adaptationsvorganges in Gegenwart von Acetat neuentstandenen jungen Zellen fehlen : Bei 50 % iger Substanzzunahme wäre demnach, wenn der Leistungsabfall allein auf den Zellzuwachs zurückginge, ein Absinken der Sauerstoffentwicklung, bezogen auf den Chlorophyllgehalt um ein Drittel zu erwarten. Die tatsächlich festgestellte Erniedrigung um mehr als 50 % (vgl. Abb. 34) kann daher nur eine partielle Inaktivierung des sauerstoffproduzierenden Systems in den stoffwechselphysiologisch umgestellten, ursprünglich autotrophen Zellen bedeuten. Außerdem nimmt die Fähigkeit zur photosynthetischen Sauerstoffentwicklung gerade zwischen der zweiten und dritten Stunde nach dem Wechsel der Kohlenstoffquelle besonders stark ab, wenn keine Chlorophyllzunahme in der Kultur stattfindet. Dieser Befund ist auch im Hinblick auf den Zeitpunkt wichtig, zu dem die Blockierung der ursprünglichen Stoffwechselprozesse im Rahmen der Umstellung auf andere Ernährungsverhältnisse einsetzt.

3.3.2. Der Einfluß des Photosynthesegiftes 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU) auf die stoffwechselphysiologische Adaptatation von Chlamydobotrys stellata

Bei den Untersuchungen über die Regulation der Chloroplastenstruktur von Chl. stellata bei einem Wechsel in der Ernährungsweise hatte sich ergeben, daß die Strukturveränderungen in unmittelbarer Beziehung zum Ablauf der Photosynthese stehen. Damit stellt sich die Frage, ob eine ähnliche Abhängigkeit auch für die stoffwechselphysiologische Adaptation der Alge, d. h. die Entwicklung der vollen Photosyntheseleistung in ursprünglich photoheterotrophen Algen bzw. die Entwicklung maximaler Leistung zur Acetatassimilation in ursprünglich autotrophen Algen, vorhanden ist.

Die Unterbrechung des photosynthetischen Elektronentransportes durch die Zugabe von DCMU zu Beginn der Adaptationszeit an die Autotrophie oder an die Photoheterotrophie wirkt sich auf die Änderung der in-vivo-Absorption und der Photosynthese unterschiedlich aus. Die Veränderungen im Absorptionsverhalten der Algen kann DCMU weder bei der Adaptation an Autotrophie noch bei Adaptation an Photoheterotrophie vollständig verhindern (Abb. 38). Die Entwicklung der Photosyntheseaktivität wird in den von photoheterotrophen auf autotrophe Ernährungsbedingungen umgestellten Algen durch DCMU, ungeachtet der durch dieses Gift unterbundenen Photosynthese und ungeachtet der völlig gehemmten Substanzvermehrung (Tab. 9, Zeile 2), nicht beeinträchtigt. Anders hingegen beim Adaptationsvorgang von der Auto-

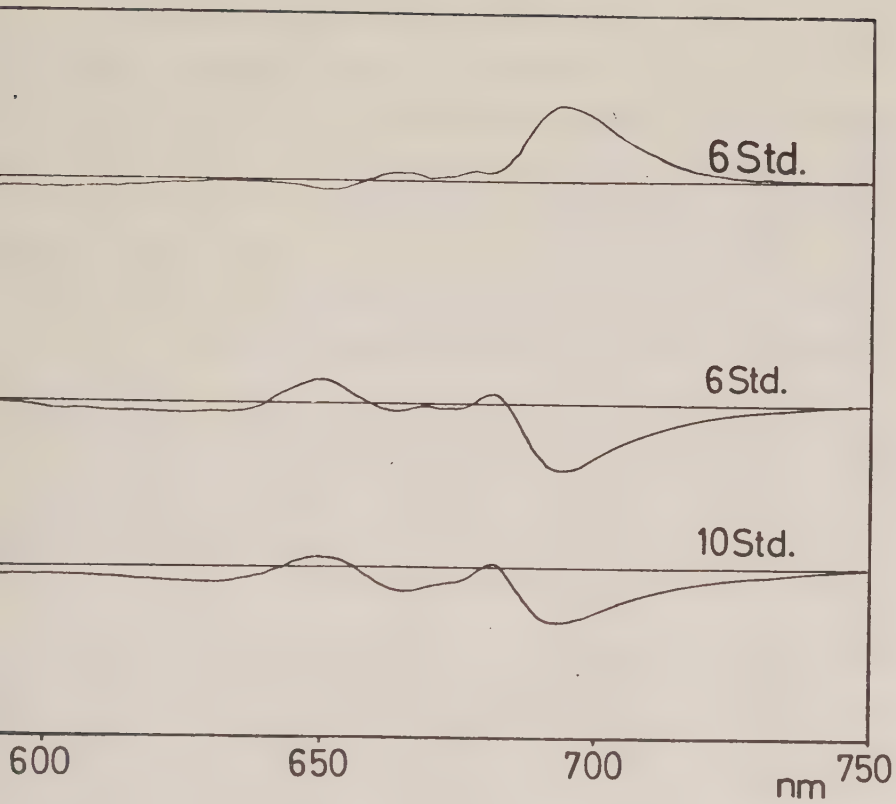


Abb. 38. Differenzspektren der Chloroplastenpartikeln von autotrophen Algen, gemessen gegen a) anschließend sechs Stunden unter photoheterotrophen Bedingungen in Gegenwart von DCMU gehaltenen Kulturen, sowie von photoheterotrophen Algen, gemessen gegen b) anschließend unter autotrophen Bedingungen in Gegenwart von DCMU gehaltenen Kulturen. c) Wie b), jedoch 10 Stunden in Gegenwart von DCMU kultiviert. (Meßbereich 0-0,5 OD).

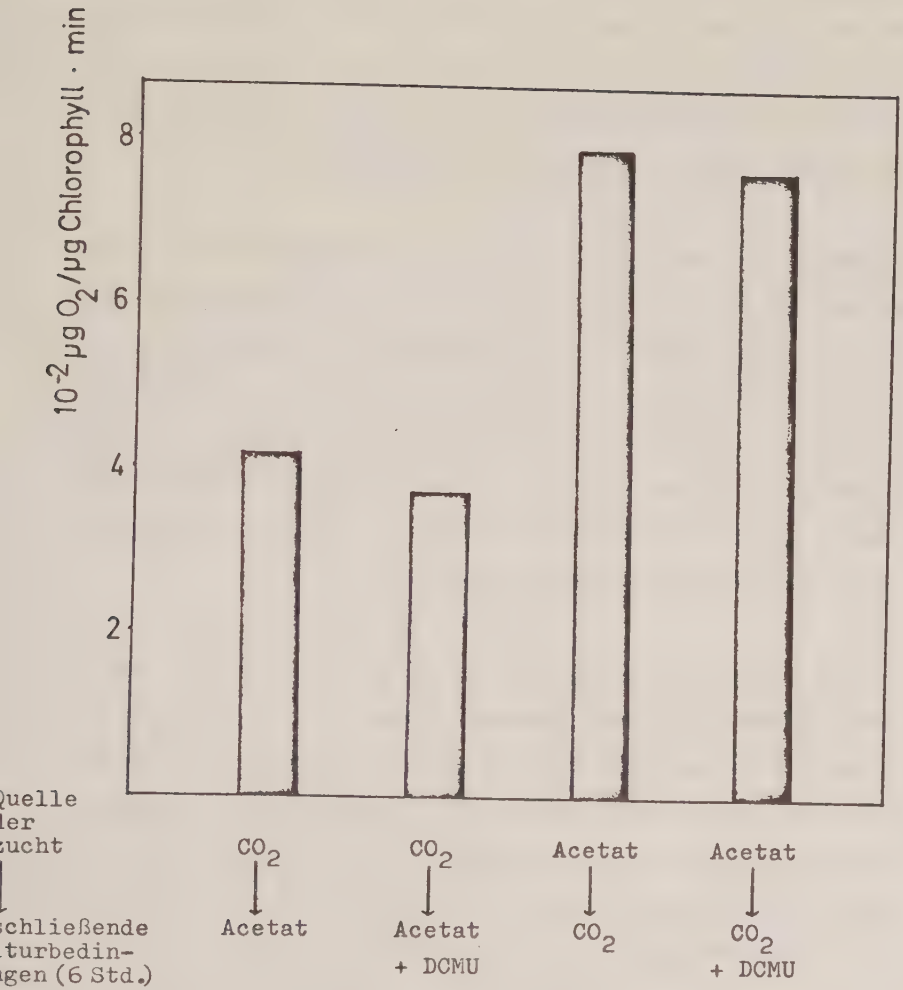
trophie an die Photoheterotrophie. In diesem Fall könnte erwartet werden, da DCMU die auf die Acetatassimilation zurückgehende Substanzvermehrung in photoheterotrophen Kulturen nicht unterbindet (Wießner 1965; Tab. 9, Zeile 1), daß dieses Gift keinen Einfluß auf die Umstellung autotroph gezogener Algen an die Ernährung mit Acetat hat. Es ergab sich jedoch, daß autotroph angezogene Kulturen von Chl. stellata in Gegenwart von DCMU nicht mit Acetat wachsen können (Tab. 9, Zeile 4): Weder ihr Trockengewicht noch ihr Gehalt an Chlorophyll und an Protein nehmen zu, während der Anstieg der potentiellen Photosyntheseleistung der unvergifteten Kontrolle gemäß verläuft (Abb. 39).

Tab. 9. Der Einfluß des Photosynthesegiftes DCMU (Konzentration 10^{-5} M) auf die in-vivo-Absorption, den Gehalt an Chlorophyll, Trockengewicht und Protein autotropher bzw. photoheterotropher Chl. stellata, sowie auf das Verhalten dieser Merkmale bei einem Wechsel in der Art der Kohlenstoffversorgung.

Zeile	C-Quelle während der Anzucht	anschließende Kulturbedingungen (6 Stunden)	Veränderungen der Absorptionsspektren	Zunahme an : Chl.	TG	Prot.
1	Acetat	+ Acetat + DCMU	-	+	+	+
2	Acetat	+ CO_2 + DCMU	±	-	-	-
3	CO_2	+ CO_2 + DCMU	-	-	-	-
4	CO_2	+ Acetat + DCMU	±	-	-	-

Diese Ergebnisse lassen folgende Schlußfolgerungen zu :

1) Obwohl auch in autotroph angezogenem Chl. stellata die zur Acetatverwertung notwendigen Enzyme, wie Isocitratlyase und Malatsynthetase konstitutiv vorhanden sind (Wießner und Kuhl



. 39. Sauerstoffproduktion durch autotroph bzw. photoheterotroph
kultivierten Chlamydobotrys stellata nach einer anschließenden
tur in Gegenwart von DCMU und einer anderen Kohlenstoffquelle.

1962), können ursprünglich autotroph kultivierte Algen beim Ausschalten der normalerweise zur Acetatassimilation nicht notwendigen Photosynthese nicht photoheterotroph wachsen. Sie erlangen diese Fähigkeit erst im Laufe eines Adaptationsvorganges, für den ein ungehinderter Ablauf der photosynthetischen CO_2-Fixierung oder des photosynthetischen Elektronentransportes notwendig sind, wobei zwischen diesen beiden Möglichkeiten im Rahmen meiner Arbeit nicht entschieden werden kann.

2) Für die Erlangung der vollen Photosyntheseleistung (gemessen als Sauerstoffentwicklung) bei photoheterotroph angezogenem Chl. stellata ist der ungehinderte Elektronentransport von System II nach I ebenfalls nicht für seine Aktiv erung bei einem Wechsel von der Autotrophie zur Photoheterotrophie notwendig. Das bedeutet, daß volle Photosyntheseleistung unabhängig von der tatsächlichen Aktivität dieses Stoffwechselvorganges ausgebildet werden kann.

3) Die Umstellung auf die Ernährung mit Acetat führt zur Inaktivierung der Photosynthese in den ursprünglich autotrophen Algenzellen; denn bei sechsstündiger Adaptation an die Photoheterotrophie in Gegenwart von DCMU erfolgt keine Substanzzunahme in den Kulturen und damit auch kein Anstieg in der Zellzahl, die Photosyntheseaktivität sinkt aber in gleicher Weise wie in den unvergifteten Kontrollen ab.

4) Die mit dem Wechsel in der Ernährungsweise verbundenen Veränderungen der Absorptionseigenschaften werden nicht durch den-

selben Mechanismus wie die Stoffwechselleistungen reguliert, denn sie können nur teilweise durch DCMU beeinflußt werden.

3.3.3. Die Wirkungen von Chloramphenicol und Cycloheximid auf die stoffwechselphysiologische Leistung von Chlamydotrys stellata

Die cytoplasmatische und die plastidäre Proteinsynthese können voneinander durch die unterschiedliche Wirkung der beiden Antibiotika Chloramphenicol und Cycloheximid unterschieden werden. Cycloheximid unterbindet die Proteinsynthese an den 80 S Ribosomen des Cytoplasma (Eisenstadt und Brawermann 1964, Bamij und Jagendorf 1966, Hoober und Blobel 1969), Chloramphenicol die Proteinsynthese an den 70 S Ribosomen der Chloroplasten (Spencer 1965, Sissakian et al. 1965, Hartmann et al. 1968). Die Anwendung dieser Hemmstoffe auf Kulturen wachsender Grünalgen gibt daher Auskunft, welche dieser beiden Arten von Proteinsynthesemöglichkeiten für die Bildung der Proteine im einzelnen verantwortlich ist.

Für Chl. stellata sollte, wie bereits einleitend gesagt wurde, nun geklärt werden, ob und in welchem Ausmaß cytoplasmatische oder plastidäre Proteinsynthesen an dem Adaptationsvorgang von der Autotrophie an die Photoheterotrophie bzw. vice versa beteiligt sind. Bevor jedoch Aussagen über mögliche Beeinflussungen der physiologischen Adaptation durch die Antibiotika getroffen werden können, muß zuvor ihre Wirkung auf normale Algenkulturen kontrolliert werden.

3.3.3.1. Die Beeinflussung autotropher Kulturen von Chlamydobotrys stellata durch Chloramphenicol und Cycloheximid

Zunächst waren die optimal wirksamen Konzentrationen der Antibiotika Chloramphenicol und Cycloheximid für jedes der beiden Gifte zu ermitteln. Hierzu wurde autotrophen Algenkulturen jeweils mindestens 14 Stunden lang verschieden hohe Chloramphenicolmengen zugesetzt und ihre Wirkung auf die Chlorophyll-, Trockengewichts- und Proteinzunahme (gemessen als Kjeldahlstickstoff) untersucht. Die Abbildung 40 a zeigt, daß bei einer Chloramphenicolkonzentration von 500 bis 700 µg/ml Kulturlösung die Trockengewichtszunahme über der der Kontrolle und erst nach ca. 12 Stunden darunter liegt. Die Proteinsynthese ist bereits nach sechs Stunden leicht erniedrigt und anschließend fast vollständig gehemmt (Abb. 40 b). Konzentrationen von 100, 500 und 700 µg/ml beeinflussen die Chlorophyllsynthese gleichermaßen, geringere Konzentrationen hemmen nicht (Abb. 40 c). Unter dem Einfluß des Chloramphenicol nimmt die Chlorophyllsynthese mit fortgesetzter Kulturdauer fortlaufend ab. Nach 14-stündiger Einwirkung (bis 24 Stunden) konnte keine Chlorophyllzunahme mehr gemessen werden. Die Untersuchungen über die Wirkung von Chloramphenicol wurden auch auf die Pigmentzusammensetzung ausgedehnt. Hierzu wurden nach 6- und nach 14-stündiger Einwirkung von Chloramphenicol die in-vivo-Absorptionsspektren der Chlorophyllkomponenten einer vergifteten und einer unvergifteten Kultur miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, daß das Absorptionsmaximum in der vergifteten Kultur in den kurzwelligeren Bereich verschoben ist (Abb. 41). Eine

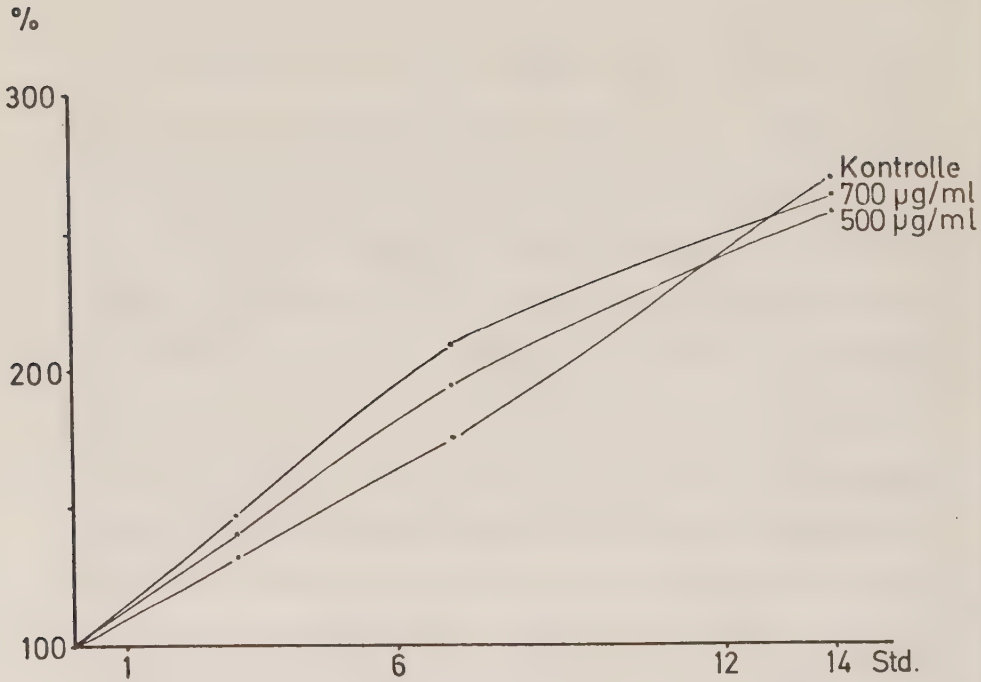


Abb. 40 a. Veränderung des Trockengewichtes von Chlamydobotrys stellata im Lauf der Kultur in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an Chloramphenicol.

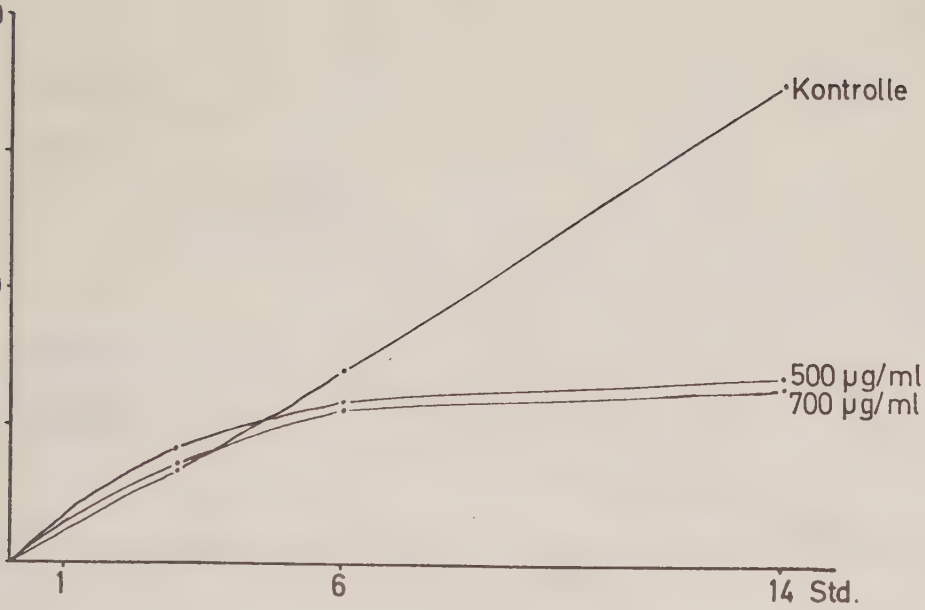


Abb. 40 b. Veränderung des Proteingehaltes von Chlamydobotrys stellata im Laufe der Kultur in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an Chloramphenicol.

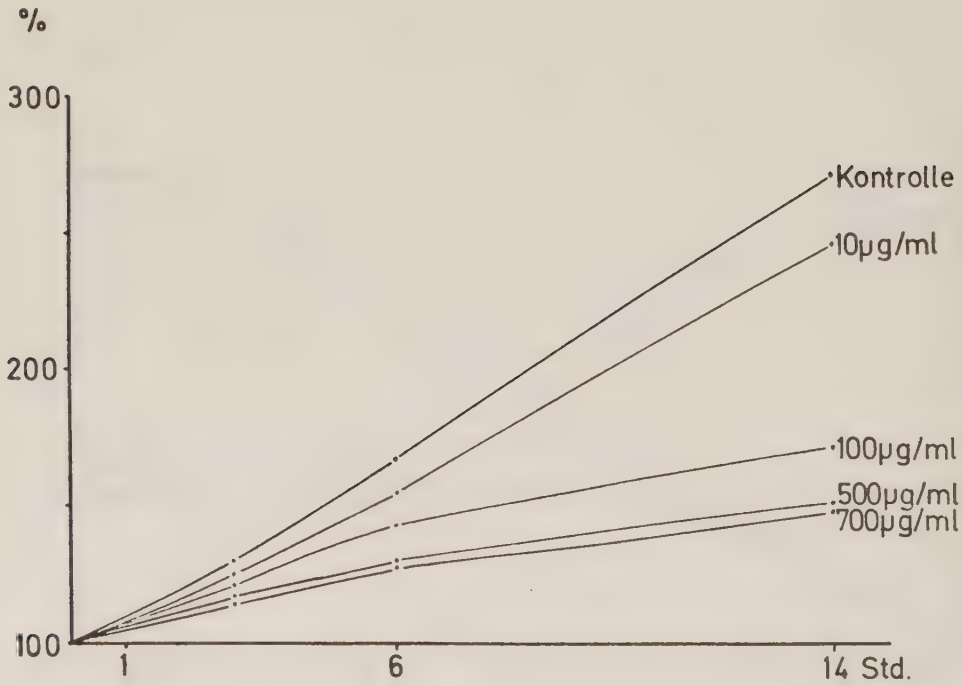


Abb. 40 c. Veränderung des Chlorophyllgehaltes von Chlamydobotrys stellata im Lauf der Kultue in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an Chloramphenicol.

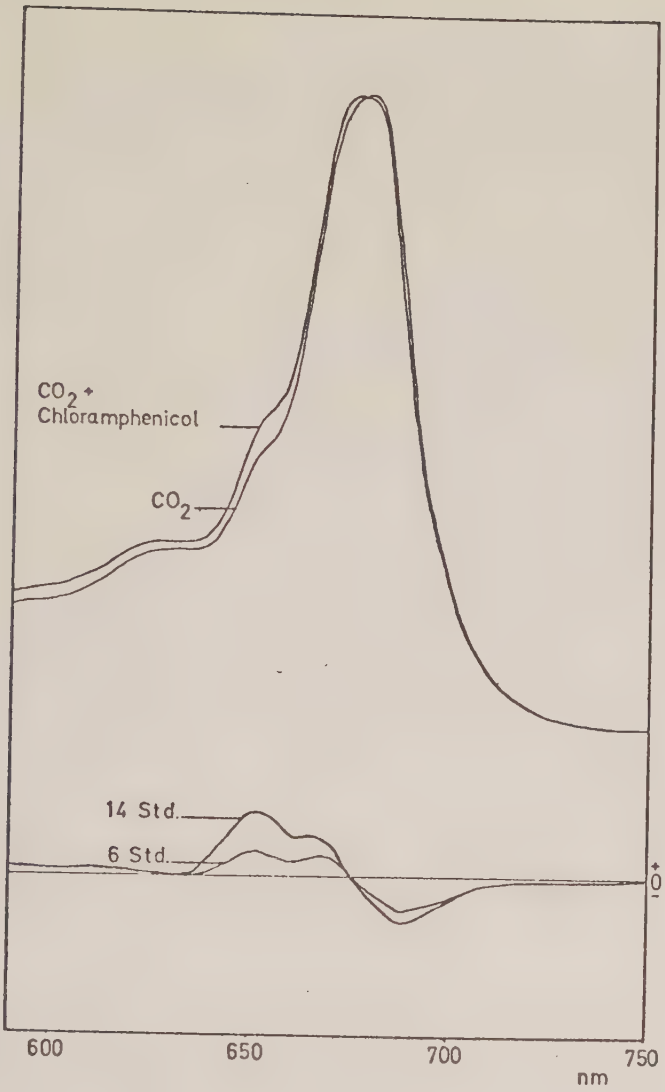


Abb. 41. Absorptionsspektrum (Meßbereich 0-1 OD) und Differenzspektrum (Meßbereich 0-0,5 OD) der Chloroplastenpartikeln von autotroph (CO_2) gezogenem Chl. stellata nach 6 bzw. 14-stündiger Einwirkung von Chloramphenicol (CO_2 + Chloramphenicol).

höhere Absorption besitzt ihr Spektrum auch im Bereich der Chlorophyll-b-Absorption bei 650 nm. Im Differenzspektrum treten die Positionen der maximalen Absorptionsdifferenzen besonders deutlich hervor : Einer geringeren Absorption der Chlorophyllkomponenten im langwelligeren Bereich steht eine höhere Absorption bei 665 - 670 nm gegenüber. Der Gipfel bei 650 nm zeigt auch hier den erhöhten Gehalt der Algen an Chlorophyll b an (Abb. 41). Übereinstimmend damit wurde im Chlorophyllextrakt ein Chlorophyll a : b Verhältnis von 3,9 : 1 gegenüber 4,8 : 1 bei der unvergifteten Kontrolle gemessen. Die spektrale Verschiebung der maximalen Absorption des Chlorophyll a in den kürzerwelligen Bereich nach Behandlung mit Chloramphenicol deutet an, daß wahrscheinlich neugebildetes Chlorophyll a unter der Einwirkung von Chloramphenicol nicht mehr an Proteine in der Membran gebunden werden kann. Ähnliche Beobachtungen machten Nikolayeva und Mitarbeiter (1970) bei Bohnenblättern, deren Chlorophylle nach der Einwirkung von Chloramphenicol eine höhere Photolabilität aufweisen. Bekannt ist ferner, daß die Absorption von gelöstem Chlorophyll a gegenüber Chlorophyll-Proteid um 15 nm in den kürzerwelligen Spektralbereich verschoben ist (Brown 1972) und diese Verschiebung auch durch die Einwirkung von Protease und Lipase auf Chlorophyll-Proteide hervorgerufen werden kann (Brown und Michel-Wolwert 1968).

Cycloheximid hemmt in einer Konzentration von 0,002 bis 30 µg/ml Kulturlösung nicht die Zunahme autotropher Kulturen von Chl. s t ellata an Trockengewicht während der ersten sechs Stunden. Erst anschließend wird die Synthese deutlich erniedrigt (Abb.

42 a). Sie ist 24 Stunden nach Zugabe des Antibiotikums völlig zum Stillstand gekommen. Die Proteinsynthese wird stärker beeinflußt, wobei die Konzentrationen von 0,002 bis 30 µg/ml Kulturlösung ungefähr gleich stark wirken. Sie lassen nur noch in den ersten Stunden eine Proteinsynthese zu (Abb. 42 b). Besonders empfindlich wird die Chlorophyllsynthese betroffen, schon eine Konzentration von 0,002 µg/ml Kulturlösung hemmt sie fast ebenso stark wie eine von 30 µg/ml. Niedrigere Konzentrationen als 0,0002 µg/ml haben keinen Einfluß auf die Chlorophyllsynthese (Abb. 42 c). Für die Versuche über den Einfluß dieses Giftes auf die Adaptation von Chl. stellata an eine andere Kohlenstoffquelle wurden jedoch Konzentrationen gewählt, die weit über der die Chlorophyllsynthese gerade hemmenden Konzentration liegen, nämlich 15 bzw. 20 µg/ml Kulturlösung. Denn nach Kirk und Allen (1965) und Kirk (1968) wird bei Euglena gracilis die Synthese von Chlorophyll bereits durch sehr niedrige Konzentrationen von Cycloheximid unterbunden, während die Synthesen von Carotinoiden und Proteinen erst durch vielfach höhere Konzentrationen (10 µg/ml) unterbunden werden.

Die lichtmikroskopische Beobachtung der mit Chloramphenicol behandelten Algen ergab, daß die Zellen nach 14 Stunden noch gut beweglich, durchschnittlich aber kleiner als unvergiftete Zellen waren und häufig ein verlängertes Rostrum aufwiesen. Mit Cycloheximid behandelte Algen waren eher größer als die Normalalgen und weniger beweglich. Wie an elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen ist (Abb. 43), haben sie außerdem einen höheren Gehalt an Stärkekörnern im Stroma des Chloroplasten

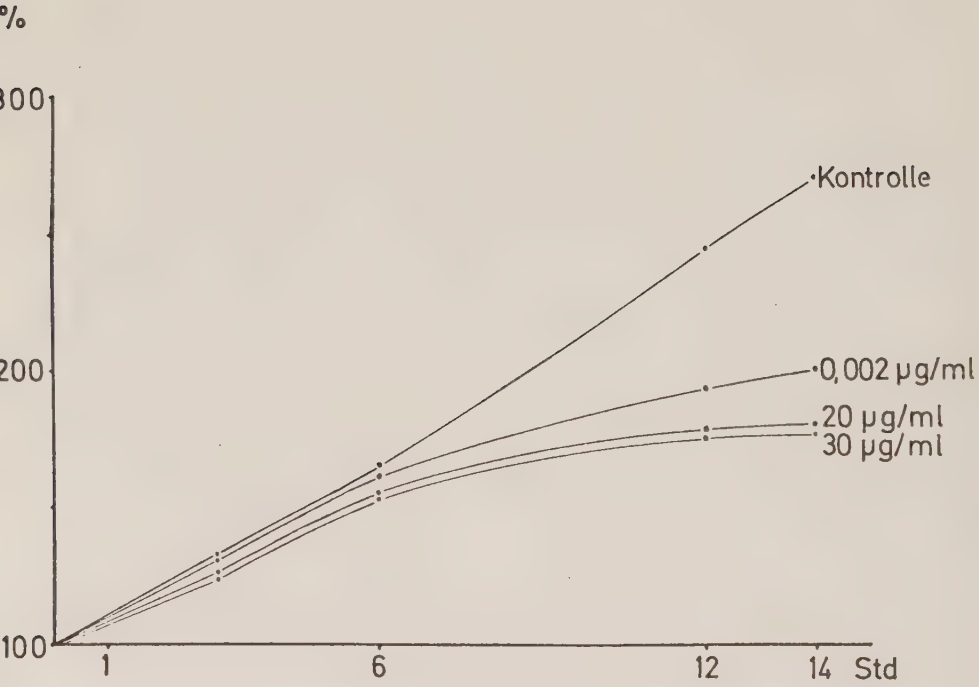


Abb. 42 a. Veränderung des Trockengewichtes von Chlamydobotrys stellata im Laufe der Kultur in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an Cycloheximid.

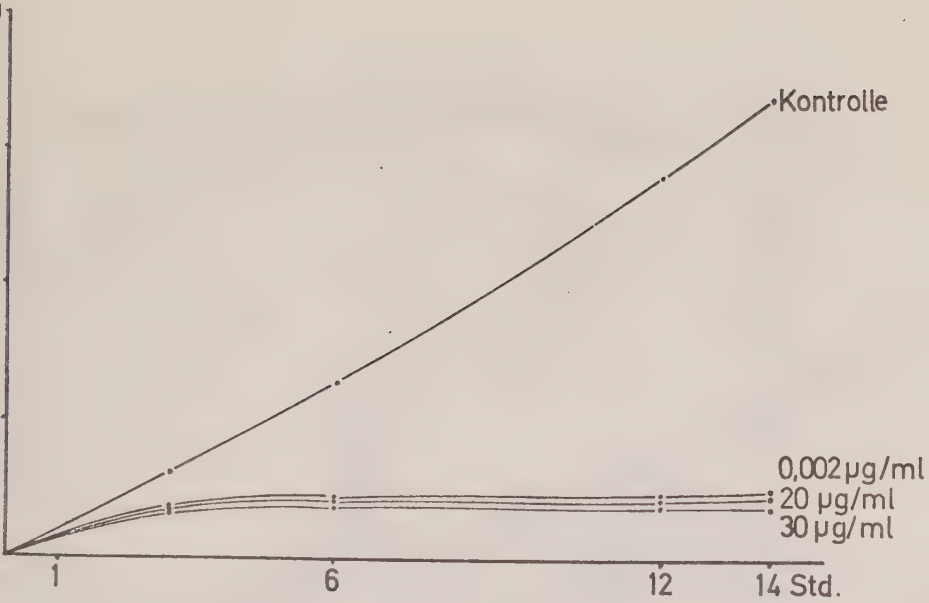


Abb. 42 b. Veränderung des Proteingehaltes von Chlamydobotrys stellata im Laufe der Kultur in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an Cycloheximid.

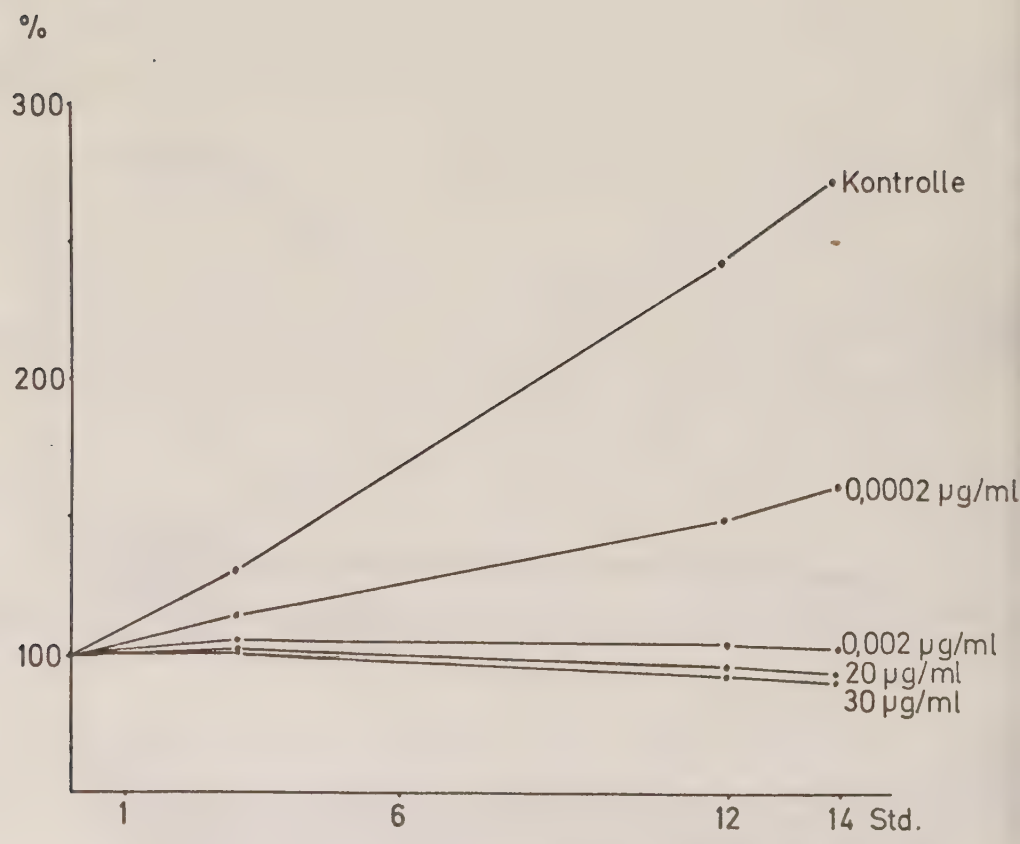


Abb. 42 c. Veränderung des Chlorophyllgehaltes von Chlamydobotrys stellata im Laufe der Kultur in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an Cycloheximid.

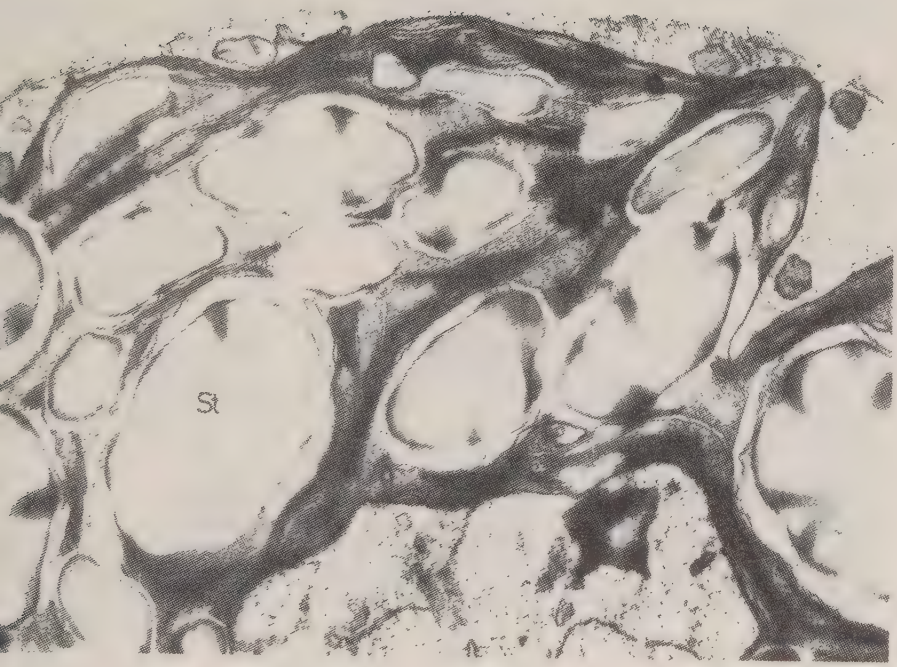


Abb.43. Ausschnitt aus der Zelle eines autotrophen, 14 Stunden mit 20 µg Cycloheximid / ml Kulturlösung gehaltenen Chlamydobotrys stellata. Das Stroma des Chloroplasten ist mit Stärkekörnern angefüllt. 25000:1

eingelagert. Das Cytoplasma der Cycloheximid-vergifteten Algen ist außerdem kontrastärmer. Eine Behandlung mit Chloramphenicol wirkt sich innerhalb von 14 Stunden kaum auf die Feinstruktur der Zelle aus (Abb. 44), lediglich der Anteil an Plastoglobuli scheint etwas erhöht zu sein. Nach 24 stündiger Einwirkung sind jedoch auch hier stärkere Zellschädigungen festzustellen; so ist die Organisation des Chloroplasten in Auflösung begriffen (Abb. 45).

Die an autotrophen Kulturen über die Wirkungen von Cycloheximid und Chloramphenicol gewonnenen Erfahrungen konnten auch bei photoheterotrophen Kulturen von Chl. stellata bestätigt werden.

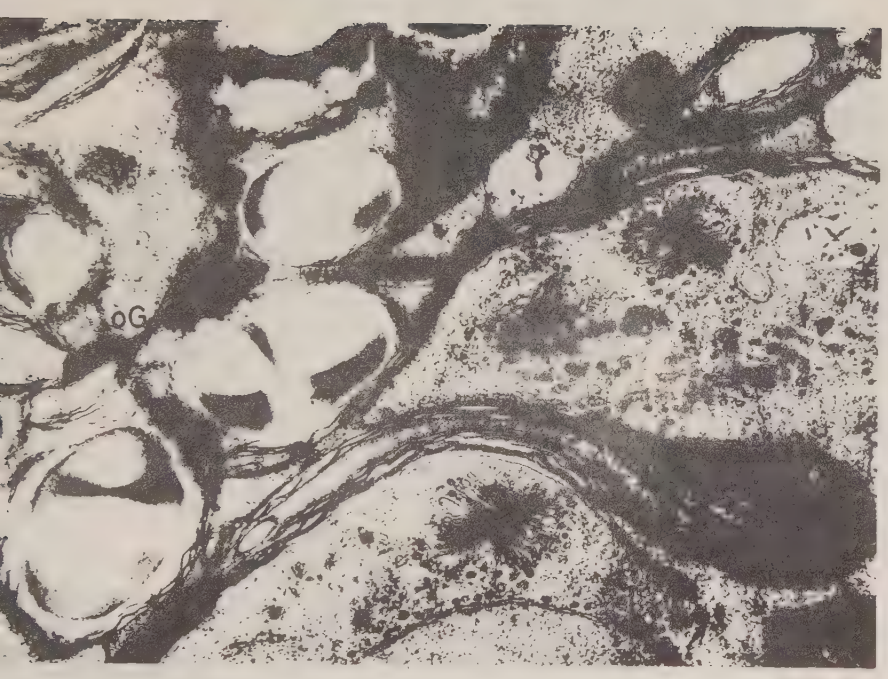


Abb.44. Ausschnitt aus der Zelle einer autotrophen, 14 Stunden mit 500 µg Chloramphenicol / ml Kulturlösung gehaltenen Chlamydobotrys stellata. Im Stroma sind mehrere Plastoglobuli zu sehen. 23000:1

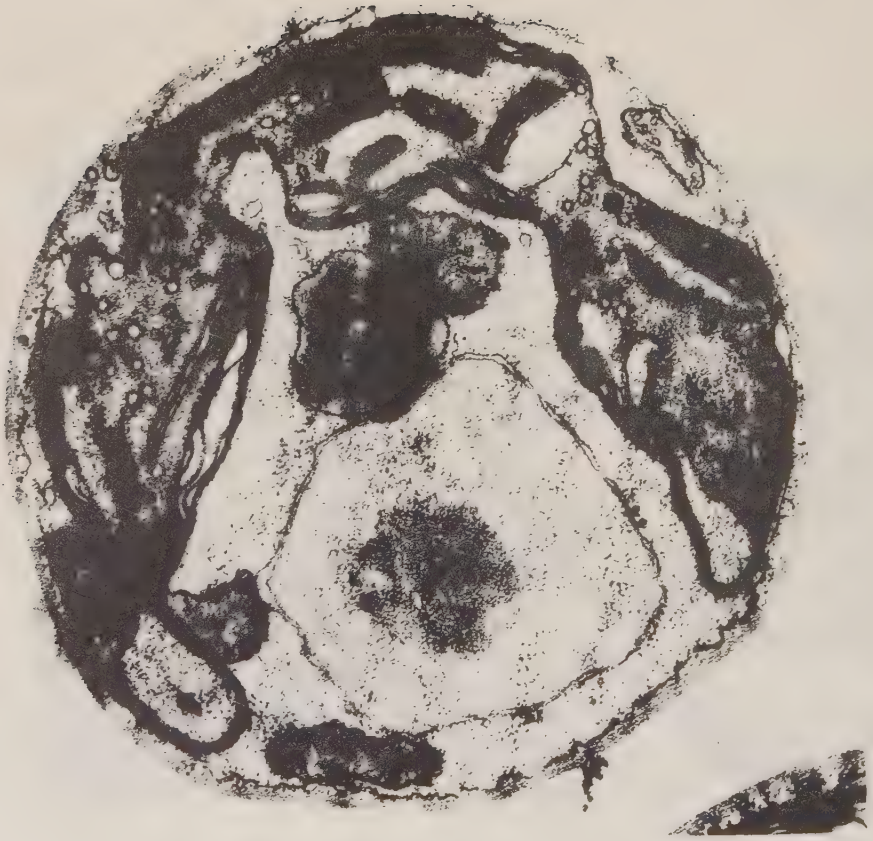


Abb.45. Querschnitt einer autotrophen und 24 Stunden mit Chloramphenicol gehaltenen Chlamydobotrys stellata. Die Zelle weist Schädigungen auf : Viele Thylakoide sind in Vesikeln zerfallen, die Stärke ist abgebaut und ein höherer Anteil Plastoglobuli tritt auf. 26000:1

3.3.3.2. Die Wirkungen von Chloramphenicol und Cycloheximid auf den Adaptationsvorgang von der Autotrophie an die Photoheterotrophie und vice versa

Nachdem im vorigen Kapitel die Kontrolluntersuchungen über die unterschiedlichen Auswirkungen von Chloramphenicol und Cycloheximid auf normal autotroph kultivierte Zellen von Chl. stellata weder innerhalb von 14 Stunden eine letale Wirkung, noch eine Beeinträchtigung der Substanzzunahme (Trockengewicht) innerhalb von sechs Stunden erbracht haben, erscheint mit die Anwendung der beiden Antibiotika bei dem nur sechsstündigen Adaptationsvorgang der Algen an eine andere Kohlenstoffversorgung unproblematisch. Allerdings müssen bei der Bewertung der folgenden Ergebnisse die der Kontrolluntersuchungen mit einbezogen werden.

Chloramphenicol kann - soweit es das Absorptionsspektrum betrifft - die Adaptation des autotroph herangezogenen Chl. stellata an photoheterotrophe Ernährungsbedingungen nicht verhindern (Abb. 46; Tab. 10, Zeile 2). So sinkt auch in den vergifteten Algen das Chlorophyll a : b -Verhältnis auf den Wert der unvergifteten autotrophen Algen ab. Der, verglichen mit der Kontrolle, nur schwache Anstieg des Chlorophyll a : b -Verhältnisses bei der Umstellung auf die Acetaternährung läßt sich auf den nach Behandlung mit Chloramphenicol allgemein höheren Chlorophyll-b-Gehalt zurückführen (vgl. das vorige Kapitel). Die Zunahme an Chlorophyll, Trockengewicht und Protein liegt zwischen 60 und 90 % der in unvergifteten Kontrollen ermittel-

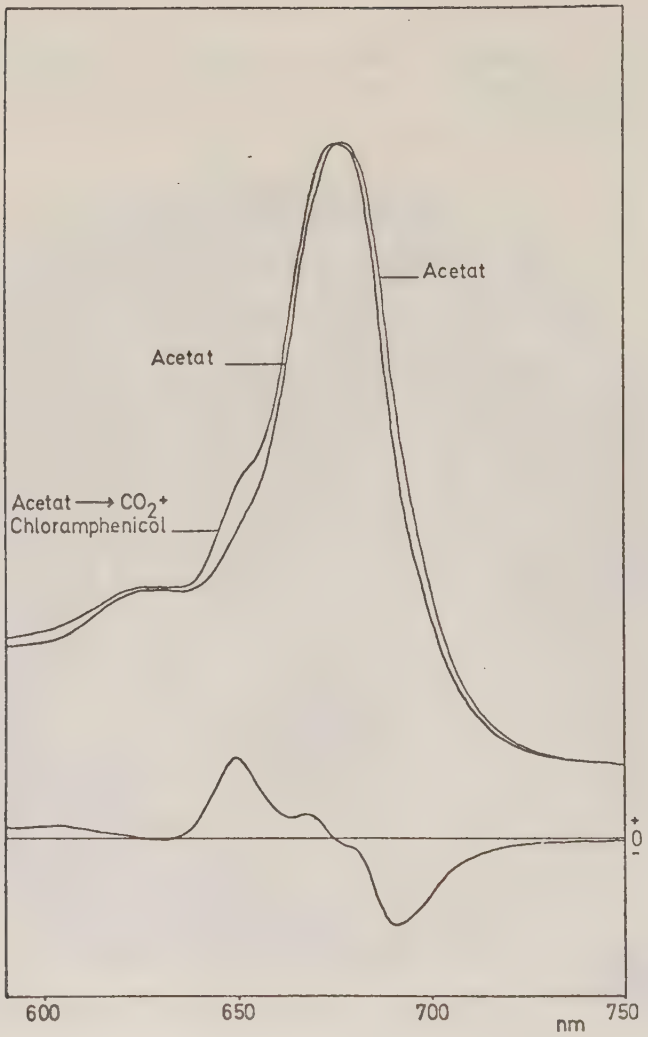


Abb. 46. Absorptionsspektrum (Meßbereich 0-1 OD) und Differenzspektrum (Meßbereich 0-0,5 OD) der Chloroplastenpartikeln photoheterotroph angezogener (Acetat) und unter dem Einfluß von Chloramphenicol an autotrophe Ernährungsbedingungen überführter Chl. stellata (Acetat ⟶ CO_2 + Chloramphenicol).

ten Werte (Abb.47). Dabei nimmt der Chlorophyllanteil während des Adaptationsvorganges an die Photoheterotrophie in etwa demselben Ausmaß zu wie in den mit Chloramphenicol vergifteten Kontrollkulturen (vgl. das vorige Kapitel). Die Fähigkeit zur Sauerstoffevolution nimmt ab und sinkt innerhalb von sechs Stunden noch unter den Wert der unvergifteten, adaptierten Kontolle (Abb. 48).

Tab 10. Die Wirkung von Chloramphenicol und Cycloheximid auf die Veränderung der Chlorophyllabsorption in vivo, das Chlorophyll a : b -Verhältnis und den Gehalt an Chlorophyll, Trockengewicht und Protein bei einem Wechsel in der Art der Kohlenstoffversorgung während der Kultur. Messungen nach sechs stündiger Einwirkung.

Reihe	C-Quelle während der Anzucht	anschließende Kulturbedingungen (6 Stunden)	Verhältnis $\frac{\text{Chl. a}}{\text{Chl. b}}$	Veränderungen der Absorptionsspektren	Zunahme an : Chl.	TG	Prot.
1	Acetat	+ CO_2 (=Kontrolle)	5,1 : 1	+	+	+	+
2	Acetat	+ CO_2 + Chloramphenicol x)	5,0 : 1	+	-	-	-
3	Acetat	+ CO_2 + Cycloheximid xx)	9,0 : 1	-	-	-	-
4	CO_2	+ Acetat (=Kontrolle)	7,8 : 1	+	+	+	+
5	CO_2	+ Acetat + Chloramphenicol x)	5,7 : 1	+	+	+	+
6	CO_2	+ Acetat + Cycloheximid xx)	5,3 : 1	-	-	-	-

x) 500 µg/ml Kulturlösung
xx) 20 µg/ml Kulturlösung

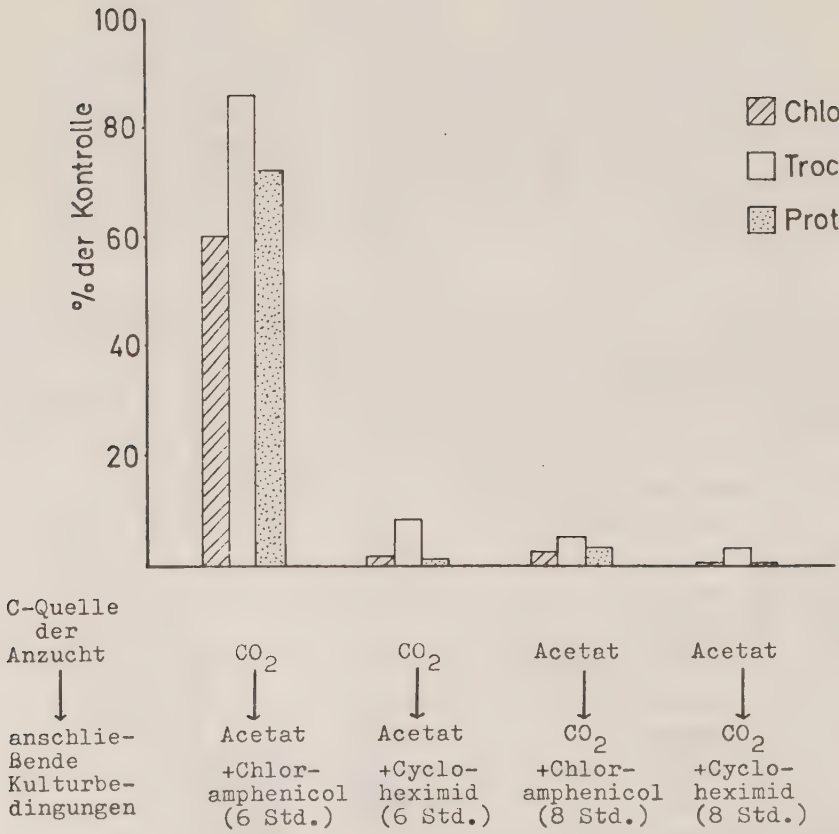


Abb. 47. Zunahme an Chlorophyll, Trockengewicht und Protein bei Chlam dobotrys stellata nach einem Wechsel der Kohlenstoffquelle in Gegenwart von Antibiotika, bezogen auf die unvergifteten Kontrollkultu (=100 %).

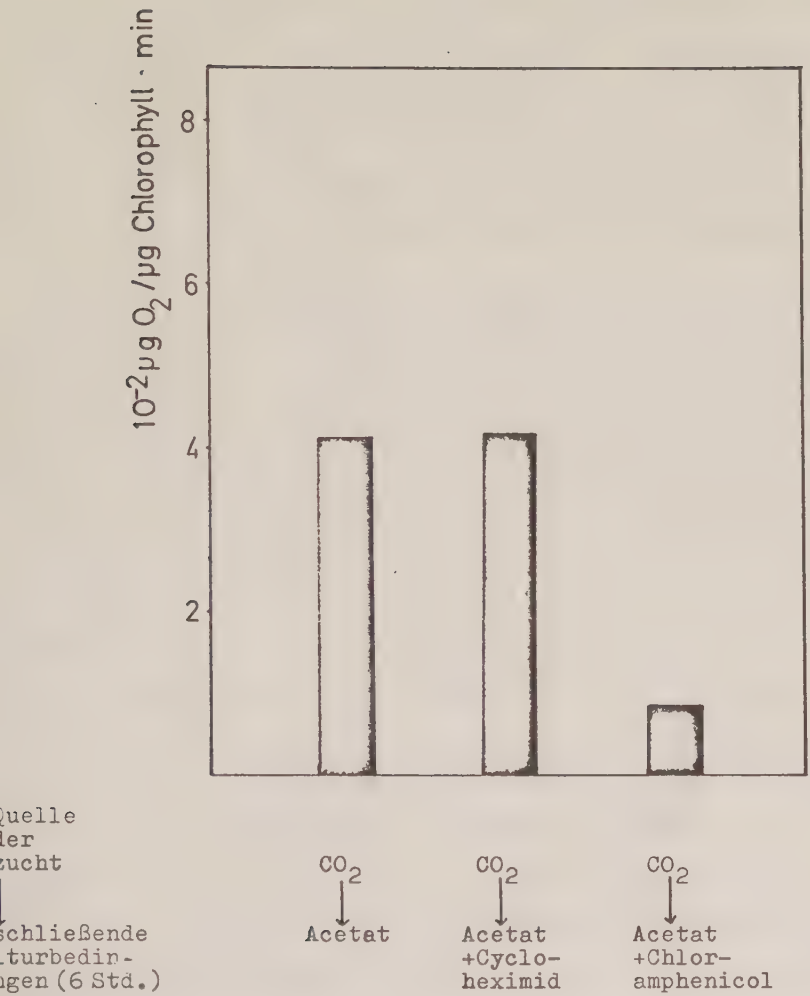


Abb. 48. Sauerstoffproduktion durch autotroph vorkultivierten und anschließend in Gegenwart von Cycloheximid bzw. Chloramphenicol sechs Stunden mit Acetat gehaltenen Chlamydobotrys stellata.

Werden photoheterotroph angezogene Chl. stellata in Gegenwart von Chloramphenicol an autotrophe Ernährungsbedingungen überführt, dann unterbleibt jede Zunahme an Substanz (Trockengewicht, Protein und Chlorophyll) in den Algenkulturen (Abb. 47). Ursache ist die Unterbindung der Entwicklung der Photosynthese durch Chloramphenicol in diesen Algen (Abb. 49).

Cycloheximid unterbindet im Gegensatz zu Chloramphenicol vollständig die normalerweise mit dem Wechsel in der Art der Kohlenstoffversorgung verbundene Veränderung der in-vivo-Absorption der Chlorophyll-a-Komponenten (Abb. 50) und ebenso jede Änderung im Chlorophyll a : b -Verhältnis :Es beträgt 9,0 : 1 bei autotroph herangezogenem Ausgangsmaterial und 5,7 : 1 bei autotroph herangezogenen Algen (Tab. 10, Zeilen 3 und 5). Der Hemmstoff Cycloheximid verhindert außerdem die bei einem Wechsel der Kohlenstoffquelle in unvergifteten Zellen auftretende stoffwechselphysiologische Adapatation. Hinweise sind a) der Stillstand jeder Trockengewichtszunahme in den vergifteten Zellen (Abb. 47), b) das Fehlen der Entwicklung der photosynthetischen Sauerstoffproduktion in den von der Photoheterotrophie auf die Autotrophie umgestellen Zellen (Abb. 49) und c) die Beibehaltung der ursprünglichen Absorptionseigenschaften der Chlorophyll-a-Komponenten. Im Gegensatz dazu verhindert Cycloheximid aber nicht die in unvergifteten Kontrollkulturen beobachtete Erniedrigung der Photosyntheseleistung während einer Adaptation an die Photoheterotrophie (Abb. 48).

Die soeben vorgestellten Ergebnisse beweisen somit, daß die

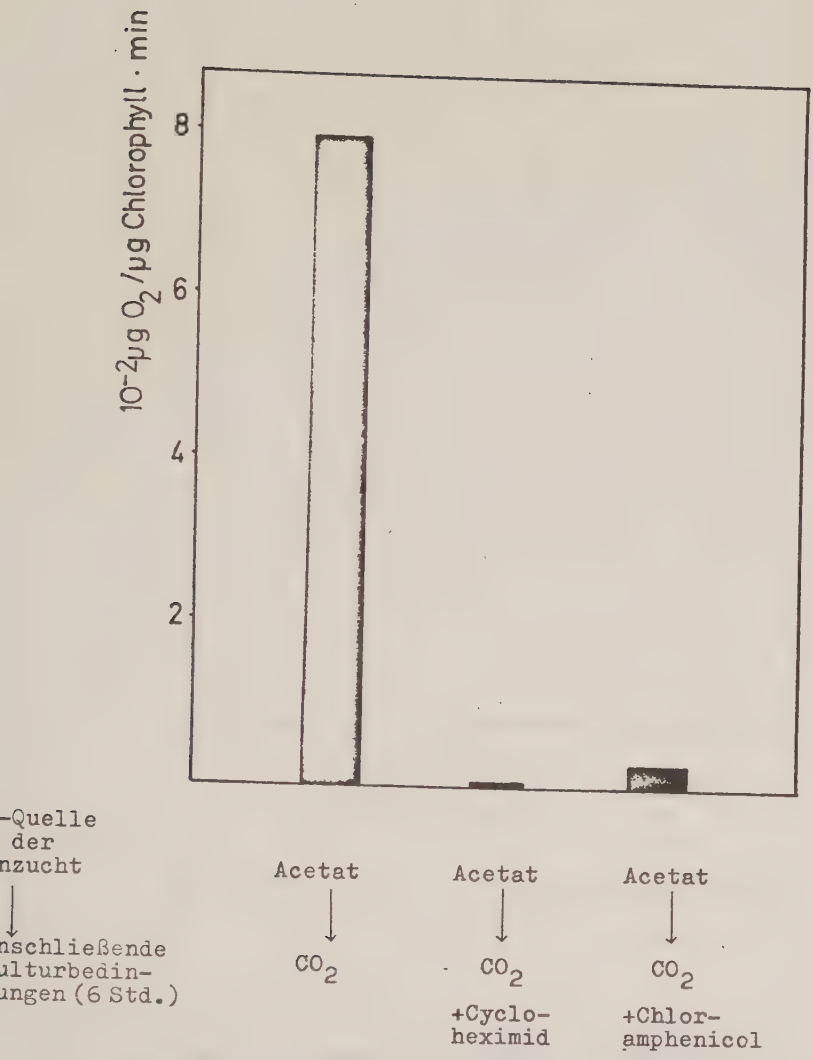


Abb. 49. Sauerstoffproduktion durch photoheterotroph vorkultivierten und anschließend sechs Stunden in Gegenwart von Cycloheximid und Chloramphenicol mit CO_2 als einziger Kohlenstoffquelle gehaltenen Chlamydobotrys stellata.

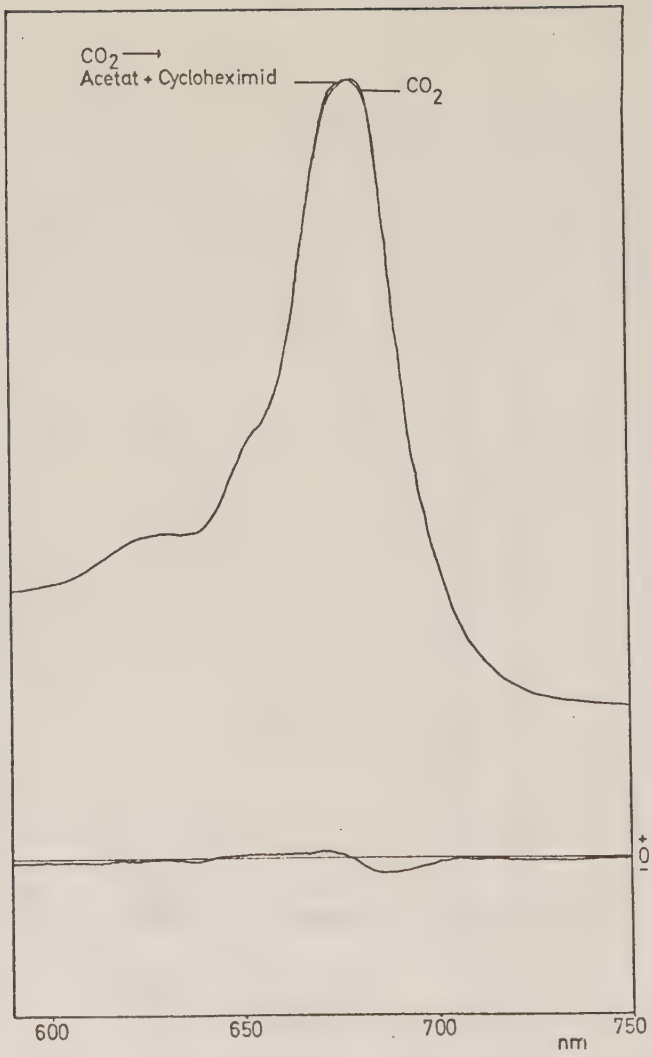


Abb. 50. Absorptionsspektrum (Meßbereich 0-1 OD) und Differenzspektrum (Meßbereich 0-0,5 OD) der Chloroplastenpartikeln von Chl. stellata nach einem Übergang von autotropher (CO_2) zu photoheterotropher Ernährung unter der Einwirkung von Cycloheximid (CO_2 ⟶ Acetat + Cycloheximid).

Adaptation von der Photoheterotrophie an die Autotrophie sowohl cytoplasmatische als auch plastidäre Proteinsynthesen erfordert. Die Adaptation von der Autotrophie an die Photoheterotrophie hingegen benötigt nur die cyctoplamatische Proteinsynthese . Offensichtlich werden die Veränderungen der Chlorophyll-a-Absorption in vivo und die Zunahme an Chlorophyll b über cytoplasmatische Proteinsynthesen reguliert, während die Fähigkeit zur Sauerstoffproduktion des ungehinderten Ablaufes beider Möglichkeiten zur Proteinsynthese bedarf. Unabhängig von Proteinsynthesen ist dagegen die Blockierung der Photosyntheseaktivität, die nach der Versorgung der Algen mit Acetat eintritt. Ferner zeigen meine Befunde, daß autotroph angezogener Chl. stellata offenbar erst aufgrund adaptiver Veränderungen die volle Fähigkeit zum Wachstum mit Acetat, trotz vorhandener Aktivität des Glyoxylsäurecyclus (Wießner 1968) erreichen, da Cycloheximid den Adaptationsvorgang unterbinden kann. Dieser Befund war bei einem "Acetat-Flagellatan" (Pringsheim 1936) nicht von vornherein zu erwarten.

3.4. Diskussion

Als wichtigstes Ergebnis dieses, der Analyse der Regulation der physiologischen Leistung von Chlamydobotrys stellata in Abhängigkeit von der Kohlenstoffversorgung gewidmeten Teils meiner Arbeit ist hervorzuheben, daß die Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Acetat während der Kultur von Chl. stellata von ausschlaggebender Bedeutung sowohl für die Entwicklung der photosynthetischen Leistung als auch für das Absorptionsverhalten in vivo ist : a) Steht Acetat als Kohlenstoffquelle zur Verfügung, so besitzt die Alge auch bei gleichzeitiger Versorgung mit Kohlendioxid alle Eigenschaften eines photoheterotrophen Organismus und b) es genügt bereits der Entzug von Acetat aus dem Nährmedium, um die Umstellung von der Photoheterotrophie auf die Autotrophie auszulösen, ohne daß eine gleichzeitige Versorgung mit CO_2 notwendig wäre. Kohlendioxid hingegen hat nicht die gleiche Bedeutung für das stoffwechselphysiologische Verhalten von Chl. stellata : a) Autotroph angezogene Algen adaptieren bei Anwesenheit von Acetat auch bei fortgesetzter CO_2-Zufuhr an die Photoheterotrophie und b) der Entzug von CO_2 alleine führt noch nicht zur Änderung der photosynthetischen Leistung. Diese Ergebnisse beweisen, daß entweder Acetat selbst oder ein Produkt seines Stoffwechsels einen ausschlaggebenden Einfluß auf die Entwicklung der optimalen Photosyntheseaktivität hat. Vergleichbare Befunde, und zwar Angaben über die hemmende Wirkung des Acetat auf die Bildung von Enzymen der photosynthetischen CO_2-Assimilation

(Ribulose-1,5-diphosphat-Carboxylase und 3-Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase) liegen für Chlorogonium elongatum (Stabenau 1971) und Euglena gracilis (App und Jagendorf 1963) vor. Bei diesen beiden Algen hemmt Acetat außerdem auch die Chlorophyllsynthese und führt zur Degeneration des Chloroplasten, während bei Chl. stellata durch Acetat lediglich die Chlorophyll-b-Synthese beeinträchtigt wird. Ursache dieses Unterschiedes ist wahrscheinlich ein grundsätzlich verschiedenes stoffwechselphysiologisches Verhalten von Chlorogonium elongatum und Euglena gracilis auf der einen und Chlamydobotrys stellata auf der anderen Seite. Während die zuerst erwähnten beiden Arten auch heterotroph im Dunkeln wachsen können und Heterotrophie bereits zur Degeneration der im Dunkeln nicht erforderlichen Chloroplasten führt, ist Chl. stellata obligat phototroph und benötigt auch unter heterotrophen Ernährungsbedingungen einen zur Photophosphorylierung voll funktionsfähigen Chloroplasten.

Meine Arbeiten haben ferner gezeigt, daß Acetat oder ein Produkt der Acetatassimilation auf zwei verschiedene Weisen in den Stoffwechsel von Chl. stellata eingreifen kann :

Einmal hemmt der Acetatstoffwechsel unmittelbar die Photosynthese, wahrscheinlich durch unmittelbaren Einfluß auf die Aktivitäten von an der photosynthetischen CO_2-Assimilation beteiligten Enzymen; denn die Blockierung der Photosyntheseaktivität durch Acetat beim Wechsel von der autotrophen zur photoheterotrophen Ernährung ist unabhängig von jeder Protein-

biosynthese. Ob Acetat selbst oder ein Produkt seines Stoffwechsels als Effektor diese Enzymaktivitäten reguliert, und wie bzw. wo diese Hemmwirkung bei Chl. stellata im einzelnen abläuft, konnte im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht ermittelt werden.

Zum anderen wirkt der Acetatstoffwechsel auf den Photosyntheseapparat über einen Regulationsmechanismus auf der Ebene der Translation ein. Dies trifft für alle diejenigen Prozesse zu, die durch die Anwesenheit von Acetat reguliert werden, bei denen der regulative Einfluß des Acetat aber gleichzeitig von Hemmstoffen der Proteinsynthese blockiert wird : Die Verschiebung der maximalen in-vivo-Absorption der Chlorophyll-a-Komponenten, die Chlorophyll-b-Synthese und die Entwicklung der Photosynthesekapazität bei der Adaptation von der Photoheterotrophie an die Autotrophie. Dabei ist herauszustellen, daß die beiden letztgenannten Prozesse direkt von der cytoplasmatischen Proteinbiosynthese abhängen; die Ausbildung der Fähigkeit zur photosynthetischen Sauerstoffentwicklung benötigt gleichzeitig auch die plastidäre Proteinbiosynthese. Dieser Befund stimmt mit Ergebnissen bei infolge Dunkelanzucht gebleichten Euglena gracilis (Pogo und Pogo 1965, Bishop et al. 1973), Chlamydomonas reinhardii (Hudock et al. 1964, Levine und Goodenough 1970, Wallach et al. 1972, aber Hoober et al. 1969) und Phaseolus vulgaris (Margulies 1964) partiell überein, bei denen gleichfalls die Abhängigkeit der Photosystem-II-Aktivität von der plastidären Proteinsynthese nachgewiesen wurde. Im Gegensatz zu den Gegebenheiten bei Chl. stellata ist die

Ausbildung der Photosyntheseleistung bei diesen Organismen jedoch von der cytoplasmatischen Proteinsynthese unabhängig. Dieser Unterschied läßt sich nicht nur durch die Verschiedenartigkeit der Versuchsobjekte und -Methoden erklären. Sie beruht sicherlich auch darauf, daß die oben genannten Versuchsobjekte aus der Dunkelanzucht für die Erlangung der Fähigkeit zu optimalem autotrophen Wachstum zuerst einen vollständigen Chloroplasten aus Proplastiden aufbauen müssen, während der photoheterotrophe Chl. stellata bereits voll entwickelte Chloroplasten besitzt und erst bei einer Adaptation an Autotrophie nur noch ein(ig)e definierte Komponente(n) des Photosyntheseapparates ausbilden muß.

Es wurde bereits erwähnt, daß die Pigmentzusammensetzung von Chl. stellata über die cytoplasmatische Proteinsynthese reguliert wird. Die Bildung der mit dem Chlorophyll a assoziierten Proteinkomponenten der Thylakoidmembranen, die erst die besonderen Absorptionseigenschaften der verschiedenen Formen hervorrufen (Wießner und French 1970), wird dagegen von der plastidären Proteinsynthese kontrolliert. Bemerkenswerterweise hängt jedoch die Veränderung der in-vivo-Absorptionseigenschaften, die im Laufe des Adaptationsvorganges an eine andere Kohlenstoffquelle stattfindet, von der cytoplasmatischen Translation ab. Möglicherweise lassen diese Befunde den Schluß zu, daß der cytoplasmatischen Proteinsynthese damit für die Regulation des Photosyntheseapparates eine der plastidären Translation übergeordnete Funktion zukommt. Dieses Postulat wird dadurch untermauert, daß Cycloheximid insgesamt sechs von

sieben untersuchten Kriterien für die adaptive Veränderung des Photosyntheseapparates hemmt, während Chloramphenicol nur bei der Ausbildung von zwei Merkmalen eingreift.

Abschließend möchte ich noch herausstellen, daß die Regulation der Photosyntheseaktivität von Chlamydobotrys stellata nicht auf den ungehinderten Elektronenfluß vom Photosystem II zum PS I angewiesen ist. Die zur optimalen photosynthetischen Leistung notwendige(n) Komponente(n) wird (werden) beim Übergang von der photoheterotrophen zur autotrophen Ernährung auch bei fortgesetzter Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes durch das Gift DCMU in die Membranen des Chloroplasten eingebaut (oder aktiviert), bzw. bei der Umstellung von der Autotrophie auf die Ernährung mit Acetat inaktiviert. Damit bestätigt meine Arbeit für Chl. stellata den von anderen Arbeitsgruppen über die Wirkung von DCMU auf ergrünende Chlorella protothecoides, Chlamydomonas reinhardii, Euglena gracilis und Phaseolus vulgaris (Matsuka und Hase 1966, Ohad et al. 1967, Schiff et al. 1967, Holt und Stern 1970, Butler et al. 1972) erbrachten Befund, wonach sich trotz DCMU-Anwesenheit der Photosyntheseapparat ungehindert entwickeln kann.

Literaturverzeichnis

Andersen, K.S., J.M. Bain, D.G. Bishop und R.M. Bishop: Photosystem II activity in agranal bundle sheath chloroplasts from Zea mays. Plant Physiol. 49, 388 (1972)

App, A.A. und A.T. Jagendorf: Repression of chloroplast development in Euglena gracilis by substrates. J. Protozool. 10, 340 (1963)

Arntzen, C.J., R.A. Dilley und F.L. Crane: A comparison of chloroplast membrane surfaces visualized by freeze-etch and negative staining techniques; and ultrastructural characterization of membrane fractions obtained from digitonin-treated spinach chloroplasts. J. Cell Biol. 43, 16 (1969)

Bamji, M.S. und A.T. Jagendorf: Amino acid incorporation by Wheat chloroplasts. Plant Physiol. 41, 764 (1966)

Berg, S., S. Dodge, D.W. Krogmann und R.A. Dilley: Chloroplast grana membrane carboxyl groups. Plant Physiol. 53, 619 (1974)

Bishop, D.G.: Lamellar structure and composition in relation to photochemical activity. In: Photosynthesis and Photorespiration, Hrsg. M.D.Hatch, C.B. Osmond und R.O. Slayter, Wiley Interscience, New York, 1971

Bishop, D.G., J.M. Bain und R.M. Smillie: The effect of antibiotics on the ultrastructure and photochemical activity of a developing chloroplast. J. Exp. Bot. 24; 361 (1973)

Branton, D. und R.B. Park: Subunits in chloroplast lamellae. J. Ultrastruct. Res. 19, 283 (1967)

Brown, J.S.: Forms of chlorophyll in vivo. Ann. Rev. Plant Physiol. 23, 73 (1972)

Brown, J.S. und M.R. Michel-Wolwertz: Chlorophyll fluorescence near 720 nm in Euglena extracts. Biochim. Biophys. Acta 153, 288 (1968)

Bullivant, S.: Freeze-etching and freeze-fracturing. In: Advanced techniques in biological electron microscopy, Hrsg. J.K. Koehler, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1973

Butler, W.L., J. De Greef, T.F. Roth und H. Oelze-Karow: The influence of CCCP and DCMU on the fusion of primary thylakoids and the formation of crystalline fibrils in bean leaves partially greened in far red light. Plant Physiol. 49, 102 (1972)

Chalcroft, J.P. und S. Bullivant: An interpretation of liver cell membrane and junction structure based on observation of freeze-fracture replicas of both sides of the fracture. J. Cell Biol. 47, 49 (1970)

Eisenstadt, J.M. und G. Brawerman: The protein-synthesizing system from the cytoplasma and the chloroplasts of Euglens gracilis. J. Mol. Biol. 10, 392 (1964)

Fineran, B.A.: The effect of various pre-treatments on the freeze-etching of root tips. J. Microscop. 92, 85 (1970)

Good, N.E.: Carbon dioxide and the Hill reaction. Plant Physiol. 38, 298 (1963)

Goodchild, D.J. und R.B. Park: Further evidence for stroma lamellae as a source of photosystem I fractions from spinach chloroplasts. Biochem. Biophys. Acta 226, 393 (1971)

Goodenough, U.W., J.J. Armstrong und R.P. Levine: Photosynthetic proprties of ac-31, a mutant strain of Chlamydomonas reinhardi devoid of chloroplast membrane stacking. Plant Physiol. 44, 1101 (1969)

Goodenough, U.W. und R.P. Levine: Chloroplast ultrastructure in mutant strains of Chlamydomonas reinhardi lacking contents of the photosynthetic apparatur. Plant Physiol. 44, 990 (1969)

Goodenough, U.W. und A. Staehelin: Structural differentiation of stacked and unstacked chloroplast membranes. J. Cell Biol. 48, 594 (1971)

Guérin-Dumartrait, E., S. Mihara und A. Moyse: Composition de Chlorella pyrenoidosa, structure des cellules et de leurs lamelles chloroplastiques, en fonction de la carence en azote et de la levée de carence. Can. J. Bot. 48, 1147 (1970)

Guérin-Dumartrait, E. und A. Moyse: Structure des lamelles chloroplastiques de Chlorella pyrenoidosa, soit au cours d'une culture synchrone, soit en fonction de la carence en azote puis de la levée de carence. Soc. Phycol. de France Bull., 15, 74 (1970)

Hartmann, G., W. Behr, K.-A. Beissner, K. Honikel und A. Sippel: Antibiotika als Hemmstoffe der Nucleinsäure- und Proteinsynthese. Angew. Chem. 18, 710 (1968)

Heise, I.J. und H. Gaffron: Catalytic effects of carbon dioxide assimilation cells. Plant + Cell Physiol. 4, 1 (1963)

Holt, S.C. und A.J. Stern: The effect of DCMU on chloroplast development and maintenance in Euglena gracilis. Plant Physiol. 45, 475 (1970)

Homann, P.H. und G.H. Schmid: Photosynthetic relations of chloroplasts with unusual structures. Plant Physiol. 42, 1619 (1967)

Hoober, J.K. und G. Blobel: Charakterization of the chloroplastic and cytoplasmatic ribosomes of Chlamydomonas reinhardi. J. Mol. Biol. 41, 121 (1969)

Hoober, J.K., P.Siekevitz und G.E.Palade: Formation of chloroplast membranes in Chlamydomonas reinhardi Y-1. Effects of inhibitors of protein synthesis. J. Biol. Chem. 222, 2621 (1969)

Howell,S.H. und E.N. Moudrianakis: Function of the "Quantasome" in photosynthesis : structur and properties of membrane bound particle active in the dark reactions of photo-phosphorylation. Proc. Natl. Acad. Sci. 58, 1261 (1967)

Hudock, G.A., G.C. Mcleod, J. Moracova-Kiely und R.P. Levine: The relation of oxygen evolution to chlorophyll and protein synthesis in a mutant strain of Chlamydomonas reinhardi. Plant Physiol. 39, 898 (1964)

Ingle, J.: The effect of light and inhibitors of chloroplast and cytoplasmatic RNA synthesis. Plant Physiol. 43, 1850 (1968)

Izawa, S. und N.E. Good: Effect of salts and electron transport on the conformation of isolated chloroplasts. II. Electron microscopy. Plant Physiol. 41, 544 (1966)

Jacobi, G.: Biochemische Untersuchungen zur Beurteilung der in wäßrigen Medien isolierten Chloroplasten. Z. Naturforsch. 18b, 314 (1963)

Jacobi, G. und H. Lehman: Photochemical activities of chloroplast fragments. In: Progress in photosynthesis research, Hrsg. H. Metzner, Tübingen Press, Tübingen, Germany, (1969)

Kirk,J.T.O.: Studies on the dependence of chlorophyll synthesis on protein synthesis in Euglena gracilis together with a nomogram for determination of chlorophyll concentration. Planta 78, 200 (1968)

Kirk, J.T.O. und R.L. Allen: Dependence of chloroplast pigment synthesis on protein-synthesis:effect of actidione. Biochem. Biophys. Res. Commun. 21, 523 (1965)

Kowallik, W.: Über die Wirkung des blauen und roten Spektralbereiches auf die Zusammensetzung und Zellteilung synchronisierter Chlorellen. Planta 58, 337 (1962)

Kreutz, W.: Neue Untersuchungen zur molekularen Architektur der Thylakoide: Erste Hinweise für eine "Protonenpumpe". Ber. Dtsch. Bot. Ges., 82, 459 (1969)

Levine, R.P. und U.W. Goodenough: The genetics of photosynthesis and of the chloroplast of Chlamydomonas reinhardi. Ann. Rev. Genetics, 4, 397 (1970)

Luft, J.H.: Improvments in epoxy resin embedding methods. J. Biophys, Biochem. Cytol., 9, 409 (1961)

Mackinney, G.: Absorption of light by chlorophyll solutions. J. Biol. Chem., 140, 315 (1941)

Margulies, M.M.: Effect of chloramphenicol on light-induced synthesis of proteins and enzymey of leaves and chloroplasts of Phaseolus vulgaris. Plant Physiol. 39, 579 (1964)

Matsuka, M. und E. Hase: The role of respiration and photosynthesis in the chloroplastregeneration in the "glucose - bleached" cells of chlorella protothecoides. Plant & Cell Physiol. 7, 149 (1966)

Matile, P. und H. Moor: Vacuolation : origin and development of the lysosomal apparatus in root tip cells. Planta 80, 159 (1968)

Mende, D. und W. Wießner: Indications for the existence of a special electron acceptor of photosystem II in photoheterotrophic cultivated Chlamydobotrys stellata not belonging to the normal non-cyclic electron transport. In: Proc. III. Int. Congr. of Photosynthesis, Rehovot Israel, 1974, im Druck

Merrett, M.: Observations on the fine structure of Chlamydobotrys stellata with particular reference to its unusual chloroplast structure. Arch. Microbiol. 65, 1 (1969)

Meyer, H.W. und H. Winkelmann: Die Darstellung von Lipiden bei der Gefrierätzpräparation und ihre Beziehung zur Strukturanalyse biologischer Membranen. Exp. Path. 4, 47 (1970)

Moor, H.: Gefrierfixation lebender Zellen und ihre Anwendung in der Elektronenmikroskopie . Z. Zellforschung 62, 546 (1964)

Moor, H.: Use of freeze-etching in the study of biological ultrastructure. Int. Rev. Exp. Path. 5, 179 (1966)

Moor, H.: Beitrag der Gefrierätzmethode zur Aufklärung von Struktur und Funktion der Biomembranen. Ber. Dtsch. Bot. Ges., 82, 385 (1969)

Morris, J.: The effect of cycloheximide on protein and nucleic acid synthesis by Chlorella . J. Exp. Bot. 18, 54 (1967)

Moudrianakis, E.N.: Structural and functional aspects of photosynthetic lamellae. Fed. Proc. 27, 1180 (1968)

Mühlethaler, K., H. Moor und J.W. Szarkowski: The ultrastructure of the chloroplast lamellae. Planta 67, 305 (1965)

Murakami, S.: On the nature of the particles attatched to the thylakoid membrane. In: Comparative biochemistry and biophysics of photosynthesis, Hrsg. K. Shibata, A. Takamiya, A.T. Jagendorf und R.C. Fuller, Tokyo University of Tokyo Press, (1968)

Nicolayeva, M.K., M.P. Vlasova und O.P.Osipova: Variation of pigment composition and structure of chloroplasts induced by chloramphenicol. Fiziol. Rastenij. 17, 5 (1970)

Ophir, J. und Y. Ben-Shaul: Separation and ultrastructure of proplastids from dark grown Euglena cells. Plant Physiol. 51, 1109 (1973)

Palade, G.E.: A study of fixation for electron microscopy. J. Exp. Med. 95, 285 (1952)

Park, R.B. und A.O. Pfeifhofer: Ultrastructural observations on deep-etched thylakoids. J. Cell Sci. 5, 299 (1969a)

Park, R.B. und A.O. Pfeifhofer: The effect of ethylenediamintetraacetate washing on the structure of spinach thylakoids. J. Cell Sci. 5, 313 (1969b)

Park, R.B. und P.V. Sane: Distribution of function and structure in chloroplast lamellae. Ann. Rev. Plant Physiol. 22, 395 (1971)

Park, R.B. und L.K. Shumway: The ultrastructure of fracture and deep etch faces of spinach thylakoids. In: Comparative Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis, Hrsg. K. Shibata, A. Takamiya, A.T. Jagendorf und R.C. Fuller, Tokyo, University of Tokyo Press (1968)

Pendland, J.C. und H.C. Aldrich: Ultrastructural organization of chloroplast thylakoids of the green alga Oocystis marssonii. J. Cell Biol. 57, 306 (1973)

Phung Nhu Hung, S., A. Lacourly und C. Sarda: Etude de l'Evolution en chloroplastes des plastes etiolés d'Orge. I. Structure examinée par cryodécapage. Z. Pflanzenphysiol. 62, 1 (1970)

Pinto da Silva, P. und D. Branton: Membrane splitting in freeze-etching. J. Cell Biol. 45, 598 (1970)

Pogo, B.G.T. und A.O.Pogo: Inhibition by chloramphenicol of chlorophyll and protein synthesis and growth in Euglena gracilis. J. Protozool. 12, 96 (1965)

Pringsheim, E.G: Über Acetatflagellaten. Naturwiss. 23, 110 (1936)

Reger, B.J., R.M. Smillie und R.C. Fuller: Light-stimulated production of a chloroplast-localized system for protein synthesis in Euglena gracilis. Plant Physiol. 50, 19 (1970)

Remy, R.: Étude de la structure des lamelles chloroplastiques de Vicia faba L. par la technique du cryodécapage. C. R. Acad. Sci. Paris 268, 3057 (1969)

Reynolds, E.S.: The use of lead citrate stain at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17, 208 (1963)

Richter, H.: Die Reaktion hochpermeabler Pflanzenzellen auf drei Gefrierschutzstoffe (Glycerin, Äthylenglycol und Dimethylsulfoxid). Protoplasma 65, 155 (1968)

Sane, P.V., D.J. Goodchild und D.J. Park: Characterzation of chloroplast photosystems 1 and 2 separated by a non-detergent method. Biochim. Biophys. Acta 216, 162 (1970)

Schiff, J.A.: Developmental interactions among cellular compartments in Euglena. In: Autonomy and Biogenesis of mitochondria and chloroplasts, Hrsg. N. K. Boardman, A.W. Linnana und R.M. Smillie, North-Holland Publishing Company (1971)

Schiff, J.A., M.H. Zeldin und J. Rubman: Chlorophyll formation and photosynthetic competence in Euglena during light-induced chloroplast development in the presence of DCMU. Plant Physiol. 42, 1716 (1967)

Schwelitz F.D, R.A. Dilley und F.L. Crane: Structural characteristics of a photosynthetic mutant of Euglena gracilis blocked in photosystem II. Plant Physiol. 50, 166 (1972)

Sissakian, N.M., I.I.Filippovich, E.N. Svetailo und K.A. Aliyev: On the protein synthesizing system of chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 95, 474 (1965)

Sitte, P.: Biomembranen: Struktur und Function. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 82, 329 (1969)

Smillie, R.M., D.G. Bishop, G.C. Gibbons, D. Graham, A.M. Grieve, J.K. Raison und B.J. Reger: Determination of the sites of synthesis of proteins and lipids of the chloroplast using chloramphenicol and cycloheximide.

Smillie, R.M., D.G. Bishop, G.C. Gibbons, D. Graham, A.M. Grieve, J.K. Raison und B.J. Reger: Determination of the sites of synthesis of proteins and lipids of the chloroplast using chloramphenicol and cycloheximide. In: Autonomy and Biogenesis of mitochondria and chloroplasts, Hrsg. N. K. Boardman, A. W. Linnane und R.M. Smillie, North-Holland Publishing Company (1971)

Spencer, D. und P.R. Whitfeld: The nature of the ribonucleic acid of isolated chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys. 117, 337 (1966)

Stabenau, H.: Die Regulation des Photosyntheseapparates bei Chlorogonium elongatum Dangard unter dem Einfluß von Licht und Acetat. Biochem. Physiol. Pflanzen 162, 371 (1971)

Staehelin, L.A.: Chloroplast fibrils linking the photosynthetic lamellae. Nature 214, 1158 (1967)

Strotmann, H., H. Hesse und K. Edelmann: Quantitative determination of coupling factor CF_1 of chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 314, 202 (1973)

Thiede, B. und W. Wießner: Mechanism of the regulation of chloroplast structure in the phototrophic alga Chlamydobotrys stellata. In: Les cycles cellulaires et leurs blocages. Colloque International du C. N. R. S., 1974 , im Druck.

Tillack, T.W. und V.T. Marchesi: Demonstration of the outer surface of freeze-etched red blood cell membranes. J. Cell Biol. 45, 649 (1970)

Valentine,R.C., B.M. Shapiro und E.R. Stadtman: Regulation of glutamine reductase. XII. Electrun microscopy of the enzyme from Escherichia coli. Biochemistry 7, 2143 (1968)

Venable, J.H. und R. Coggeshall: A simplified citrate stain for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 25, 407 (1965)

Wallach, D., S. Bar-Nun und I. Ohad: Biogenesis of chloroplast membranes. Biochim. Biophys. Acta 267, 125 (1972)

Wehrli, E., K. Mühlethaler und H. Moor: Membrane structure as seen with a double replica method for freeze fracturing. Exp. Cell Res. 59, 336 (1970)

Wießner, W.: Stoffwechselleistung und Enzymaktivität bei Chlamydobotrys stellata (Volvocales). Arch. Microbiol. 45, 33 (1963)

Wießner, W.: Quantum requirement for acetate assimilation and its significance for quantum measurements in photophosphorylation. Nature 205, 56 (1965)

Wießner, W.: Enzymaktivität und Kohlenstoffassimilation bei Grünalgen unterschiedlichen ernährungsphysiologischen Typs. Planta 79, 92 (1968)

Wießner, W.: Effect of autotrophic or photoheterotrophic growth conditions on in vivo absorption of visible light by green algae. Photosynthetica 3, 225 (1969)

Wießner, W.: Photometabolism of organic substrats. In: Photobiology of microorganisms, Hrsg. Per Halldal, Bartolomew Press, Dorking (1970)

Wießner, W. und F. Amelunxen: Beziehungen zwischen submikroskopischer Chloroplastenstruktur und Art der Kohlenstoffquelle unter phototrophen Ernährungsbedingungen bei Chlamydobotrys stellata. Arch. Mikrobiol. 66, 14 (1969a)

Wießner, W. und F. Amelunxen: Umwandlung der submikroskopischen Chloroplastenstruktur parallel zur Veränderung der stoffwechselphysiologischen Leistung von Chlamydobotrys stellata. Arch. Mikrobiol. 67, 357 (1969b)

Wießner, W. und D.C. Fork: The development of system 2 activity in Chlamydobotrys stellata during transition from photoheterotrophic to autotrophic nutrition. Year Book 69 Carnegie Institution of Washington (1969)

Wießner, W. und C.S. French: The forms of native chlorophyll in Chlamydobotrys stellata and their changes during adaptation from photo-heterotrophic to autotrophic growth. Planta 94, 78 (1970)

Wießner, W. und H. Gaffron: Role of photosynthesis in the light-induced assimilation of acetate by Chlamydobotrys. Nature 201, 725 (1964)

Wießner, W. und A. Kuhl: Die Bedeutung des Glyoxylsäurezyclus für die Photoassimilation von Acetat bei phototrophen Algen. Vorträge aus dem Gesamtgebiet der Botanik, N. F. 1., 102 (1962) Gustav Fischer Verlag Stuttgart

Zusammenfassung

1) Die Granastruktur der Chloroplasten von autotroph kultiviertem Chlamydobotrys stellata beruht a) auf einer Strukturkomponente (="stacking-Komponente) und b) auf bestimmten bei normaler Photosynthese vorliegenden Ladungsverhältnissen der Thylakoide.

2) Die "stacking"-Komponente ist sowohl in den Thylakoidmembranen autotroph kultivierter als auch in denjenigen photoheterotroph angezogener Chl. stellata vorhanden, im letzteren Fall allerdings in inaktiver Form. Die Aktivierung dieser Komponente erfolgt weder über eine plastidäre noch eine cytoplasmatische Proteinsynthese, sondern direkt über den Entzug von Acetat als Kohlenstoffquelle

3) Die stromaseitigen Flächen der Thylakoidmembranen sind mit Partikeln von 110 Å Größe, die Membranbruchflächen mit Partikeln von 160 Å und 110 Å Größe in einem Verhältnis von 1 : 4 besetzt. Die Thylakoide photoheterotroph und autotroph angezogener Chl. stellata unterscheiden sich elektronenmikroskopisch, ausgenommen in ihrer räumlichen Orientierung, nicht voneinander.

4) Die physiologische Adaptation des photoheterotroph angezogenen Chl. stellata an die Autotrophie bzw. vice versa hängt ursächlich von der Versorgung des Organismus mit Acetat ab, nicht hingegen von der Anwesenheit des Kohlendioxid. Dabei erniedrigt Acetat (oder ein Produkt der Acetatassimilation) a) unmittelbar als Effektor die Photosyntheseaktivität und reguliert b) die Zusammensetzung und die Kapazität des Photosyntheseapparates hauptsächlich über cytoplasmatische, teils auch über plastidäre Proteinsynthesen.

5) Die Regulation der Photosyntheseaktivität ist unabhängig vom ungestörten Ablauf des photosynthetischen Elektronentransportes.

Für die Themenstellung und für sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit danke ich Herrn Professor Dr. W. Wießner.

Herrn Professor Dr. F. Amelunxen, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Kiel, verdanke ich meine Grundkenntnisse in der Elektronenmikroskopie. Ihm, sowie Herrn Professor Dr. F. Mayer und Herrn Dr. E. Spieß, beide Abteilung für Mikromorphologie des Mikrobiologischen Institutes der Universität Göttingen, danke ich für kritische Diskussionen und Anregungen.

Herr R. Schopf stellte mir isolierte Chloroplasten aus Spinat zur Verfügung, Frau L. Marks führte den Markierungsversuch durch. Beiden möchte ich an dieser Stelle danken.

Von September 1972 bis Juli 1974 wurde diese Arbeit durch ein Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz unterstützt.

Lebenslauf

Bettina Thiede, geboren am 19.3. 1946 in Lahde jetzt Petershagen als Tochter des Apothekers Ludwig Stackmann und seiner Ehefrau Sigrid, geb. von Krogh.

1952 - 1957	Besuch der Volksschule in Lahde
1957 - 1960	Besuch des Staatl. Altsprachl. Gymnasiums in Minden
1960 - 1966	Besuch des Aufbaugymnasiums in Petershagen
Ostern 1966	Ablegung des Abiturs
Juli bis Dezember 1966	Praktikum im Schülerheim der Michaelis-Schule in Vryheid / Süd-Afrika
SS 1967	Beginn des Studiums der Biologie und der Chemie , Universität Göttingen
April 1969	Ablegung der Zwischenprüfung in Biologie und Chemie
Juni 1972	Ablegung des Staatsexamens für das Lehramt an Gymnasien in Biologie und Chemie und des Diploms in Biologie
1.9. 1972	Beginn mit der Arbeit für die vorliegende Dissertation unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Wießner am Pflanzenphysiologischen Institut der Georg-August-Universität in Göttingen
29. 3. 1973	Heirat mit Uwe Thiede
1. 8. 1974	Ernennung zur Studienreferendarin